

THE UNIVERSITY OF MICHIGAN LIBRARY
ANN ARBOR, MICHIGAN

Original Contribution to the
Journal of the
Royal Society of Medicine
and the Allied Medical Sciences
Vol. 10, No. 1, 1917

Original
Contribution
to the
Journal of the
Royal Society of Medicine
and the Allied Medical Sciences
Vol. 10, No. 1, 1917

DIE REGULATION DER DURCH STICKSTOFFMANGEL AUSGELÖSTEN
SEKUNDÄRCAROTINOIDBILDUNG BEI ANKISTRODESMUS

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
der Doktorwürde der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt
von
Bernhard Starosta
aus
München

Juli 1970



1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Hager

2. Berichterstatter: Professor Dr. O. Kandler

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juli 1970

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. ALLGEMEINE METHODEN	3
1. Material und Anzucht	3
2. Isolierung der Pigmente	3
2.1. Darstellung des Pigmentextraktes und Auftrennung der Pigmente mittels Dünnschichtchromatographie	3
2.2. Methoden zur Erhöhung der Trennschärfe bei lipidreichen Pigmentextrakten	5
2.3. Darstellung von Astacin aus Astacinestern	6
3. Quantitative Bestimmung der Pigmente	7
3.1. Messung und Berechnung der Pigmentmengen	7
3.2. Kalkulation des Extinktionskoeffizienten $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ für Astacin in Äthanol	7
3.3. Benutzte Bezugsgrößen	10
4. Bestimmung der Nitratkonzentration in der Nährlösung	12
5. Bestimmung der Glukoseaufnahme	13
6. Messung der photosynthetischen O_2 -Entwicklung und des O_2 -Verbrauchs durch die Atmung	13
III. ERGEBNISSE	15
A. VERÄNDERUNGEN DER PIGMENTGARNITUR BEI PHYSIOLOGISCHEM STICKSTOFFMANGEL	15
1. Auftreten des Sekundärcarotinoids (SC) Astacin in 3 verschiedenen Estern	15
2. Kinetik der Primärpigmentabnahme und Astacinbildung	18
3. Pigmentrestitution bei Aufhebung des Stickstoffmangels und Verschiebung der Pigmentmengenverhältnisse während der Restitution	21

4. Versuche zur Lokalisation der Astacin- ester in der Zelle	23
5. Kurze Diskussion	25
6. Zusammenfassung	27

B. INDUKTION DER ASTACINBILDUNG IN N-HALTIGEN
NORMALKULTUREN BEI KULTIVIERUNG IN SAUREM
NÄHRMEDIUM 28

1. Einleitung	28
2. Auftreten von Astacin bei Kultivierung in saurem Nährmedium	28
3. Versuche zur Aufklärung der Aciditätswir- kung auf die Astacinbildung	30
3.1. pH-Werte des Zellhomogenats N-haltiger und N-freier Kulturen	30
3.2. Mengenverhältnisse von Violaxanthin: Zeaxanthin als Kriterium der Acidi- tätswirkung	31
3.3. Einfluß der Acidität auf N-freie Kul- turen	32
3.4. Blockierung der Nitrataufnahme durch niederes Außen-pH	33
4. Kurze Diskussion	34
5. Zusammenfassung	35

C. INDUKTION DER ASTACINBILDUNG DURCH HEMMSTOFFE
DER PROTEIN- UND NUCLEINSÄURESYNTHESE 36

1. Einleitung	36
2. Induktion der Astacinbildung in N-haltigen Kulturen durch Actidion und die Basenanaloga Fluoruracil, Mercaptopurin und Azaguanin	36
3. Zeitlicher Verlauf der Astacinbildung in den Hemmstoffkulturen	38
4. Quantitative Beziehungen zwischen Primär- pigmenten und Astacin in Hemmstoffkulturen und N-freien Kulturen	40
5. Einfluß von Chloramphenicol (CAP) auf die Astacinsynthese	42
6. Kurze Diskussion	42
7. Zusammenfassung	43

	Seite
D. DIE ABHÄNGIGKEIT DER SEKUNDÄRCAROTINOIDSYNTHESE VOM KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL	45
Einleitung	45
<u>Abschnitt 1:</u> Einige physiologische Merkmale N-freier Kulturen in Beziehung zum Kohlenhydratstoffwechsel	46
1. Einstellung der Vermehrung	46
2. Verstärkte Lipidsynthese	47
3. Beziehungen zwischen photosynthetischer O ₂ -Entwicklung und Chlorophyllabnahme	48
<u>Abschnitt 2:</u> Die Sekundärcarotinoidbildung bei autotropher Ernährungsweise	51
1. Unterdrückung der Astacinbildung durch DCMU	51
2. Unterdrückung der Astacinbildung durch o-Phenanthrolin, Salicylaldehyd, Dini- trophenol, Isonicotinsäurehydrazid und ihr Einfluß auf die Photosynthese	52
3. Einfluß von Chloramphenicol (CAP)	55
3.1. Unterdrückung der Astacinbildung und Aufhebung der CAP-Wirkung durch Glukosezusatz	55
3.2. Einfluß von CAP auf die ¹⁴ CO ₂ - Fixierung	56
4. Unterdrückung der Astacinbildung durch N ₂ -Begasung im Licht	58
<u>Abschnitt 3:</u> Die Sekundärcarotinoidsynthese bei hetero- und mixotropher Er- nährungsweise	60
1. Die Bleichwirkung der Saccharose in N- haltigen Normalkulturen	60
2. Einfluß von Glukose auf die Pigmentzu- sammensetzung in N-freien Kulturen	61
3. Unterdrückung der Astacinbildung in Dun- kelkulturen durch o-Phenanthrolin, Sali- cylaldehyd, Dinitrophenol und Na-diäthyl- dithiocarbamat und der Einfluß dieser Substanzen auf die Glukoseaufnahme und den O ₂ -Verbrauch durch die Atmung	62

	Seite
4. Unterdrückung der Astacinbildung durch N ₂ -Begasung glukosehaltiger Dunkelkulturen	67
5. Fehlen einer CAP-Wirkung in glukosehaltigen N-freien Dunkelkulturen	68
6. Kurze Diskussion	70
7. Zusammenfassung	70
E. UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOGENESE DES ASTACINS	72
1. Einleitung	72
2. Mengenbeziehungen zwischen Astacin und Trihydroxy- α -carotin	72
2.1. Trihydroxy- α -carotin als mögliche Vorstufe des Astacins	72
2.2. Kurzzeitige Korrelation der Mengenänderungen von Trihydroxy- α -carotin und Astacin	73
3. Versuche mit verschiedenen "Hemmstoffen der Carotinoidsynthese"	76
4. Qualitative Studien an Pigmentmutanten	77
5. Alterung und Sekundärcarotinoidbildung: Einfluß von Kinetin und Gibberellinsäure	82
6. Isotopenmarkierungsversuche zur Frage der SC-Bildung aus Abbauprodukten des Chlorophylls	84
6.1. Allgemeine Bemerkungen	84
6.2. Methode	84
6.3. Fütterungsversuche mit ¹⁴ C-Aminolae- vulinsäure, ¹⁴ C-Mevalonsäure und ¹⁴ C- Carbonat. Vergleich der spezif. Akti- vitäten von Chlorophyll, Lutein und Astacin	88
7. Zusammenfassung	94
IV. ABSCHLIESSENDE DISKUSSION	96
V. ABSCHLIESSENDE ZUSAMMENFASSUNG	101
VI. LITERATURVERZEICHNIS	104

Verwendete Abkürzungen

CAP	Chloramphenicol
^{14}C -ALS	5-Aminolaevulinsäure-4- ^{14}C -Hydrochlorid
^{14}C -MVS	2- ^{14}C -Mevalonsäure
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-Dimethyl-Harnstoff
DDC	Natrium-Diäthylthiocarbamat
DNP	2,4-Dinitrophenol
IsNH	Isonicotinsäurehydrazid
KH	Kohlenhydrate
o-Phen	o-Phenanthrolin
Sal	Salicylaldoxim
SC	Sekundärcarotinoid (e)

I. EINLEITUNG

Entzieht man grünen Pflanzen aus ihrem Nährmedium physiologisch verwertbaren Stickstoff (z.B. Nitrat- oder Ammoniumsalze), so treten in der Regel nach einiger Zeit Pigmentierungsschäden auf. Die unzureichende Stickstoffernährung kann zum Abbau sowohl von Chlorophyllen als auch Carotinoiden führen. Da jedoch der Chlorophyllabbau schneller voranschreitet treten Farbänderungen nach Gelb ein.

Unter den Grünalgen gibt es nun einzelne Vertreter, welche unter N-Mangel einen Abbau der vorhandenen Pigmente zeigen, daneben aber neue, meist rötlich gefärbte Carotinoide synthetisieren. Da diese neuen Carotinoide in der primären Pigmentaustattung nicht zu finden sind, bezeichnet man sie auch als Sekundärcarotinoide (SC).

Das Auftreten von Sekundärcarotinoiden unter N-Mangel wurde bisher bei Vertretern folgender Grünalgenfamilien beobachtet: Chlamydomonaceae, Oocystaceae, Scenedesmaceae, Hydrodictyaceae (CZYGAN 1968a und 1968b), Chlorococcaceae (ACCADIA et al. 1966, McLEAN 1967) und Dasycladaceae (KLEINIG und EGGER 1967). Bei diesen roten SC handelt es sich vornehmlich um oxydierte Xanthophylle, bei welchen der Sauerstoff als Ketogruppe vorliegt. Solche Ketocarotinoide sind z.B. das Echinenon, Canthaxanthin, Astaxanthin und Astacin. Genauer untersucht wurde die Erscheinung der SC-Bildung von TISCHER (1936, 1941 und 1944) bei *Euglena heliorubescens* und *Haematococcus pluvialis*. Das von ihm isolierte rote Sekundärcarotinoid ging in die Literatur zunächst unter dem Namen Euglenarhodon und Haematochrom ein. KUHN et al. (1939) identifizierten dieses Pigment als ein 3, 4, 3', 4' - Tetra-Keto- β -Carotin, das bereits als sog. Astacin bekannt war. In der ruhenden Cyste von *Haematococcus* tritt dieses Sekundärcarotinoid mit Fettsäuren verestert in großer Menge außerhalb des Chromatophoren auf und erfüllt nahezu das ganze Zellumen. Das orange-rot gefärbte Ketocarotinoid Astacin bzw. seine reduzierte Form Astaxanthin (3, 3' - Dihydroxy - 4, 4' - diketo- β -carotin) ist auch im

Tierreich weit verbreitet. Die Reindarstellung dieses Pigments erfolgte erstmals aus tierischem Material, da es hier in größeren Mengen vorliegt. Es findet sich vornehmlich bei Echinodermen, Crustaceen und in einzelnen Wirbeltierklassen, z.B. bei Fischen oder Vögeln (Rotfärbung des Gefieders bei Flamingos). Manchmal (z.B. beim Flußkreb) tritt das Astacin als chromophore Gruppe eines blaugrünen Chromoproteids auf. Durch Eintauchen des Krebses in siedendes Wasser wird diese Gruppe frei und bewirkt das "Rotwerden".

Die durch physiologischen Stickstoffmangel ausgelöste Bildung der rötlichen SC bei grünen Algen ist ein entwicklungsphysiologisches Problem, das nun in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde. Vor allem stand die Frage nach dem Zusammenhang des Stickstoffwechsels und der Biosynthese von SC im Vordergrund. Da aber auch andere Ursachen eine SC-Bildung auslösen können, wie z.B. niederer pH-Wert des Nährmediums oder ein Überangebot an Glucose, war die Frage nach dem gemeinsamen Wirkungszusammenhang zu stellen und zu prüfen, welche Stoffwechselprozesse durch diese verschiedenen Faktoren beeinflusst werden, die dann letztlich zur SC-Bildung führen müssen.

Weiter war zu untersuchen, wie die Biogenese der SC verläuft, ob sie entweder durch Umwandlung aus bestimmten Primärxanthophyllen oder Chlorophyllen entstehen (wie das z.B. von CZYGAN 1967 postuliert wird) oder ob sie de novo gebildet werden. Durch Anstellung stöchiometrischer Vergleiche zwischen Primärxanthophyllen und Astacin, durch Herstellung von Pigmentmutanten und mittels Isotopenmarkierung wurde versucht, auch dieses Problem anzugehen. Dabei wurde die Veränderung der Carotinoidzusammensetzung in allen Komponenten quantitativ verfolgt. Die gewonnenen Ergebnisse über die Ursachen der SC-Bildung wurden in einem Schema zusammengefaßt.

II. ALLGEMEINE METHODEN

1. Material und Anzucht

Von den 3 untersuchten Algenarten, welche zur SC-Synthese befähigt sind [Chlorella pyrenoidosa, Scenedesmus Naegelii und Ankistrodesmus spec. (Stamm München)] erwies sich Ankistrodesmus als das günstigste Versuchsobjekt. Diese Alge zeigt die Symptome des N-Mangels bereits nach wenigen Tagen und vermehrt sich schnell unter relativ bescheidenen Kulturbedingungen.

Ankistrodesmus wurde auf Schrägagar steril gezüchtet. Die Herstellung von Flüssigkeitskulturen für Versuchszwecke erfolgte durch Beimpfen der vorher autoklavierten, rein anorganischen Nährlösung nach KESSLER (1963). In den N-freien Kulturen wurde anstelle von Kaliumnitrat zum osmotischen Ausgleich eine äquivalente Menge Kaliumchlorid zugesetzt. Die Anzucht erfolgte bei Dauerlicht von 7500 Lux und unter Temperaturkonstanz (Wasserbad) in 45cm langen Kulturröhrren von 550ml Inhalt. Die Algen wurden durch einen kontinuierlichen, mit CO₂ angereicherten Luftstrom begast, der vorher eine Waschflasche mit 8%iger Phosphorsäure und ein Wattefilter passierte. In Fällen, in denen besondere Sterilität geboten war, wurden Schüttelkulturen (Fernbachkolben) angesetzt.

Vorteilhaft für alle Versuche erwies sich die auch von anderen Autoren beobachtete Eigenschaft von Ankistrodesmus, über sehr lange Zeit frei von Verunreinigungen durch Bakterien bleiben zu können. PIRSON et al. (1952) nehmen an, daß das "antibiotische Prinzip" bei Ankistrodesmus besonders stark ausgebildet ist.

2. Isolierung der Pigmente

2.1. Darstellung des Pigmentextraktes und Auftrennung der Pigmente mittels Dünnschichtchromatographie

Ein definiertes Volumen Algensuspension (meist 20ml) wurde in

acetonbeständigen Kunststoffbechern bei 5000 x g abzentrifugiert. Das Algensediment wurde in Aceton aufgenommen und in Homogenisiergefäße überführt, in welche vorher zu etwa 1/5 des Gefäßvolumens kleine und große Glasperlen (0,5mm^ø und 3mm^ø) eingefüllt worden waren. Anschließend wurde das Zellmaterial in einem Glasperlenhomogenisator (B. Braun, Melsungen, Typ 2876) 3 min unter CO₂-Kühlung bei Stufe 1 homogenisiert und durch eine Glasfilternutsche G3 von acetonunlöslichen Zellbestandteilen befreit. Der Pigmentextrakt wurde alsdann im Rotationsverdampfer auf ein bestimmtes Volumen eingengt. Zur Trockengewichtsbestimmung benutzte Kultursuspensionen wurden nach Abtrennung von der Nährlösung zweimal mit aqua dest. gewaschen und bei 105°C getrocknet. Die Auftrennung des Pigmentextraktes erfolgte dünnschichtchromatographisch nach der Methode HAGER und MEYER-BERTENRATH (1966).

Abbildung 1 zeigt schematisch die Pigmentaauftrennung eines Normalkulturextraktes von *Ankistrodesmus* auf der Dünnschicht A (Kieselgur/Kieselgel/Calciumcarbonat).

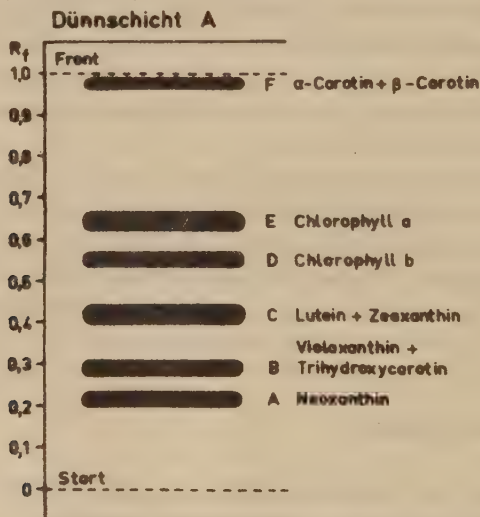


Abb. 1: Trennung der Pigmente einer Normalkultur von *Ankistrodesmus* an Dünnschicht A. Fließmittel Benzin:Isopropanol:Wasser = 100:10:0,25. Zur wahrscheinlichen Struktur von Trihydroxycarotin s. STRANSKY (1969) und AIZETMÜLLER et al. (1969)

Zur Erfassung aller Pigmente wurden die Zonen B, C und F auf Dünnschicht B (Calciumcarbonat Magnesiumoxid Calciumhydroxid; s. HAGER und MEYER-BERTENRATH, 1966) rechromatographiert und in ihre Komponenten aufgetrennt.

2.2. Methoden zur Erhöhung der Trennschärfe bei lipidreichen Pigmentextrakten

Pigmentextrakte von Stickstoffmangelkulturen beeinträchtigen durch ihren hohen Lipidanteil die chromatographische Trennschärfe durch Schlierenbildung ganz erheblich. Durch Abtrennung der Lipide nach folgendem Verfahren kann die Trennqualität verbessert werden:

1. Vorlauf mit unpolaren Lösungsmitteln an Dünnschicht A.

Dafür eignen sich folgende Fließmittel

- a) Spezialbenzin: Petroläther : Äther = 80:40:20
- b) Siedegrenzenbenzin (Kp. 110-140°C)

Bei der Vortrennung mit unpolaren Lösungsmitteln läuft der Hauptanteil der Lipide an der Laufmittelfront. Die Lage der einzelnen Lipidzonen kann durch Jodierung (Einbringen der Platten in Joddampf) oder durch Fluoreszenz im UV-Licht bestimmt werden.

Die Vortrennung wird unterbrochen, wenn die Laufmittelfront etwa $\frac{3}{4}$ Laufhöhe erreicht hat. Die Platten werden etwas getrocknet und zur Nachtrennung in das A-Platten-Laufmittelgemisch gebracht.

2. Vorchromatographie auf Kieselgelplatten

Kieselgel G-Schichten werden häufig zur Auftrennung von Lipidgemischen in einzelne Verbindungsklassen benutzt. Da Kieselgel G starke Adsorptionseigenschaften besitzt, die sich ungünstig auf die Eluierung der Pigmente auswirken, erwies sich eine Beschichtung mit Kieselgel (ohne Gips) und Kieselgur im Verhältnis 1:1 als günstiger. Das Gemisch wird 1 min mit 60ml

Wasser durchgeschüttelt, sofort mit dem Ausstreichgerät aufgetragen und etwa eine Stunde bei 90°C getrocknet.

Als Laufmittel eignet sich ein Gemisch aus Petroläther: Äther: Isopropanol = 80:20:5. Alle Pigmente mit Ausnahme von α - und β -Carotin bleiben im Startbereich sitzen. Die farblosen Lipide werden aus dem Pigmentgemisch heraustransportiert und in einzelnen Banden abgesetzt.

Auf dieser modifizierten Kieselgelplatte können die Lipide ebenfalls gut abgetrennt werden, wobei sich alle Pigmente mühelos eluieren lassen.

2.3. Darstellung von Astacin aus Astacinestern

Das unter N-Mangel auftretende Sekundäracarotinoid Astacin erscheint in Form von 3 verschiedenen Estern als rötliche Banden P_1 , P_2 und P_3 auf der Dünnschicht A (s. Abb. 3). Zur scharfen Abtrennung von P_1 und P_2 muß dabei der Isopropanolanteil im Laufmittelgemisch von 12ml auf 8,7ml reduziert werden. Lipidreiche Extrakte wurden nach den angegebenen Verfahren vorgereinigt. P_3 läuft zusammen mit dem Carotin an der Front und kann auf zweierlei Weise auf der selben Dünnschicht von diesem bequem abgetrennt werden:

- a) das noch laufmittelfeuchte Chromatogramm wird mit einer Glasplatte abgedeckt. Das schwerer flüchtige Benzin - am Verdunsten gehindert - treibt in 10 - 15 min das Carotin quantitativ aus P_3 ;
- b) das entwickelte Chromatogramm wird leicht getrocknet und umgekehrt in Benzin gestellt. Das Carotin wandert in entgegengesetzter Laufrichtung aus P_3 .

Zur Darstellung freien Astacins wurden die Ester P_1 , P_2 und P_3 vereinigt und über Nacht mit 10%iger methanolischer KOH verseift. Das Verseifungsgemisch wurde anschließend im Schütteltrichter in Äther/Petroläther überführt und auf den modifizierten Kieselgelplatten in Astacin und freie Fettsäuren

aufgetrennt. Als Laufmittel diene Petroläther:Äther:Isopropanol:Eisessig = 100:20:5:1. Zur Überprüfung auf quantitative Verseifung wurde das Astacin erneut auf A-Platten aufgetragen. Das freie Astacin zeigt einen anderen R_f -Wert als die Ester P_1 , P_2 und P_3 (s. Abb. 4, S. 16).

3. Quantitative Bestimmung der Pigmente

3.1. Messung und Berechnung der Pigmentmengen

Zur quantitativen Erfassung der Pigmente werden die einzelnen Farbstoffzonen in einem bestimmten Lösungsmittel eluiert, auf ein bestimmtes Volumen z eingestellt und bei der Wellenlänge ihres Absorptionsmaximums $\lambda_{\max}$ im Beckmann-Spektrophotometer gemessen. Aus der ermittelten Extinktion E und dem bekannten Extinktionskoeffizienten $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ errechnet sich die absolute Pigmentmenge P , z.B. pro Gramm Trockengewicht nach der Formel:

$$P = \frac{z \cdot E \cdot 10^4}{E_{1\text{cm}}^{1\%}} \cdot \frac{a}{b \cdot w} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{g Tr.gew.}} \right]$$

a = ml des Pigmentextraktes

b = ml der auf die Dünnschicht aufgetragenen Extraktmenge

w = Trockengewicht in g der zur Pigmentgewinnung verwendeten Algenmenge

3.2. Kalkulation des Extinktionskoeffizienten $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ für Astacin in Äthanol

DERSCH (1960) benutzte zur quantitativen Bestimmung von Astacin in Hexan den Extinktionskoeffizienten $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2500$. Dieser Wert wurde von GOODWIN (1949) für Astaxanthin ermittelt. In

neuerer Literatur gibt GOODWIN (1965) für Astacin in Pyridin $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 1690$ an. Auf Grund der besseren Eluierungseigenschaften des Astacins durch Äthanol ($\lambda_{\text{max}} 478$) mußte dafür ein neuer Extinktionskoeffizient ermittelt werden. Wir benutzten dabei den bekannten Extinktionskoeffizienten für Astacin in Pyridin als Bezugsgröße und berechneten aus den unterschiedlichen Extinktionen gleichkonzentrierter Lösungen von Astacin in Pyridin und Äthanol den neuen Extinktionskoeffizienten für Astacin in Äthanol. Abb. 2 zeigt das Absorptionsspektrum von Astacin in Äthanol mit $\lambda_{\text{max}} 478$ nm.

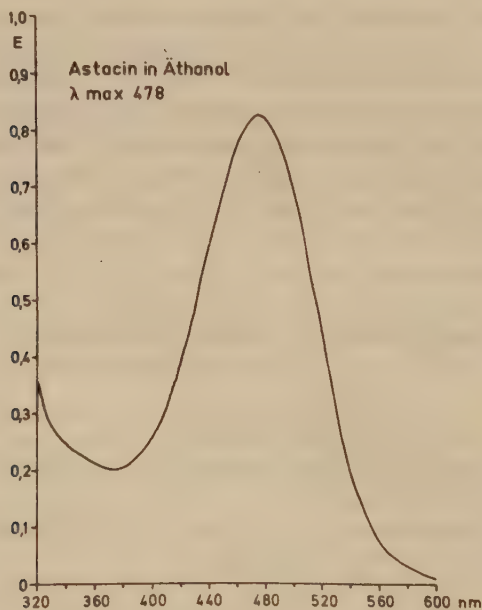


Abb. 2: Absorptionsspektrum von Astacin in Äthanol

In nachstehender Meßreihe sind die Extinktionswerte verschiedenen konzentrierter Lösungen von Astacin in Pyridin und die der entsprechenden Vergleichsproben von Astacin in Äthanol

aufgeführt:

E Pyridin (λ max 490)	E Äthanol (λ max 478)	Faktor
0,78	0,92	1,18
0,64	0,77	1,20
0,50	0,60	1,20
0,25	0,32	1,28

Nach dem Bouguer-Lambert-Beerschen Gesetz gilt

$$E = \log \frac{J_0}{J} = \epsilon' \cdot c \cdot d$$

E = gemessene Extinktion

ϵ' = spezifischer Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke (cm)

Für die Extinktion in Pyridin sei:

$$I. \quad E_1 = \epsilon'_1 \cdot c_1 \cdot d_1$$

$$I. \quad c'_1 \cdot d_1 = \frac{\epsilon'_1}{E_1}$$

Für die Extinktion in Äthanol sei:

$$II. \quad E_2 = \epsilon'_2 \cdot c_2 \cdot d_2$$

$$II. \quad c'_2 \cdot d_2 = \frac{\epsilon'_2}{E_2}$$

Da die Konzentration c und die Schichtdicke d in beiden Pro-

ben dieselbe ist, gilt:

$$c_1' \cdot d_1 = c_2' \cdot d_2$$

daraus folgt I. = II.:

$$\frac{\epsilon_1'}{E_1} = \frac{\epsilon_2'}{E_2}$$

$$\epsilon_2' = \frac{\epsilon_1' \cdot E_2}{E_1}$$

$$\text{da } E_{1\text{cm}}^{1\%} = \epsilon\% = \epsilon' \cdot 10^{-1} \quad \text{bzw. } \epsilon' = 10 \cdot \epsilon\%$$

$$\text{so folgt } 10\epsilon_2\% = 10 \cdot \epsilon_1\% \cdot \frac{E_2}{E_1}$$

$$\epsilon\% \text{ Äthanol} = \epsilon\% \text{ Pyridin} \cdot \frac{E_2}{E_1}$$

Aus den Werten der obigen Meßreihe errechnet sich somit für Astacin in Äthanol ein Extinktionskoeffizient $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2045$

3.3. Benutzte Bezugsgrößen

a) Trockengewicht

Im allgemeinen wurde auf die Verwendung des Trockengewichts als Bezugsgröße verzichtet, da unterschiedlich behandelte Kultursuspensionen bei relativ geringen Änderungen der Primärpigmentmengen in ihren Trockensubstanzmengen oftmals erhebliche Unterschiede aufweisen.

So bewirkt z.B. N-Mangel eine Vergrößerung der Zellen und eine Zunahme an Trockensubstanz durch Anhäufung von Lipiden. Das Trockengewicht wurde daher als Bezugseinheit nur dort angewendet, wo es zur Beschreibung eines bloßen Phänomens durch keine andere Bezugseinheit ersetzt werden konnte, wo bei Kurzzeit-Versuchen keine störende Veränderung der Trockensubstanzmenge zu erwarten war und wo bei bestimmten Hemmstoffversuchen nachweislich keine störenden Veränderungen auftraten.

b) Volumen Algensuspension

Die Verwendung einer bestimmten Volumeneinheit Algensuspension als Bezugsgröße erweist sich in all denjenigen Fällen von Vorteil, in denen z.B. der Einfluß von Hemmstoffen auf die Bildung bzw. Unterdrückung von Pigmenten oder die photosynthetische O_2 -Entwicklung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle untersucht werden soll. Dabei ist Voraussetzung, daß die behandelte und unbehandelte Kultur aus einer einheitlichen Suspension hervorgeht (Anfangswert) und bei Probeentnahme auf ihr Anfangsvolumen überprüft wird (unterschiedliche Abdunstung möglich). Zur Beurteilung der Hemmwirkung einer bestimmten Substanz spielt es dabei keine Rolle, wenn z.B. die Pigmentzunahme in der Kontrolle auch auf eine Zellvermehrung zurückzuführen ist. Nicht dagegen geeignet wäre diese Bezugseinheit, wenn zwei oder mehrere N-freie Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten in Bezug auf ihren "Mangelzustand" miteinander verglichen werden sollten, da aus einer unterschiedlichen Zellvermehrung auch unterschiedliche Mengen an Algenmaterial pro Volumeneinheit resultieren.

c) Gesamtpigmentmenge

In einzelnen Fällen wurde der Mengenanteil eines einzelnen Carotinoids z.B. von Astacin in % der Gesamtpigmentmenge als relatives Maß erfaßt. Da die Gesamtmenge der Primärpigmente z.B. in N-freien Kulturen nicht konstant bleibt, kann

auf diese Weise gut die sich ändernde Relation von neugebildetem Astacin zur Abnahme der Primärpigmente dargestellt werden. Allerdings kann die Gesamtpigmentmenge zur Ermittlung absoluter Farbstoffmengen nicht als Bezugseinheit herangezogen werden, da sie selbst je nach Versuchsbedingung Schwankungen unterliegt.

d) Zellzahl

Zur Kontrolle auf Vermehrung wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Blutkörperchen-Zählkammer bestimmt. Es wurde jedoch von der Zellzahl als Bezugsgröße kein Gebrauch gemacht, da *Ankistrodesmus* in Abhängigkeit von den Außenbedingungen Polymorphismus aufweist. Unterschiedlich behandelte Kulturen zeigen zumeist auch Zellen unterschiedlicher Größe und Gestalt.

e) Schlußbemerkung

Es schien uns wichtig, in einer eigenen Betrachtung auf die Vor- und Nachteile der benutzten Bezugsgrößen einzugehen. Vor allem sollte man sich des Aussagewertes quantitativer Angaben beim Literaturstudium bewußt sein. Die obige Betrachtung hat gezeigt, daß keine ideale Bezugsgröße möglich ist, sondern je nach Versuchsbedingungen das eine oder andere Maß angewandt werden muß. Die häufige Verwendung des Gesamtstickstoffs als Bezugseinheit schied für unsere Zwecke von vornherein aus, da unsere Versuche vornehmlich an N-Mangelkulturen durchgeführt werden.

4. Bestimmung der Nitratkonzentration in der Nährlösung

Die Bestimmung der Nitratkonzentration in der Nährlösung erfolgte kolorimetrisch mit Diphenylamin, das mit Nitrat in H_2SO_4 eine blaue Farbe gibt, die vom Ammoniumsalz des Diphenylbenzidins herrührt (MÜLLER 1957). Zu 0,5ml Probelösung werden 5ml Reagenz zugesetzt und nach 2std im Photometer bei 590nm gegen das farblose Reagenz gemessen. Aus einer vorher aufgestellten Eichkurve

kann ein Bereich von 5 - 35mg KNO_3 /1ml abgelesen werden.

Reagenz: 10mg Diphenylamin werden in 90ml Wasser gegeben. Ferner gibt man 200mg NH_4Cl in 100ml H_2SO_4 konz. und erhitzt 1 Std auf 80°C . Unter Kühlen wird die so bereitete H_2SO_4 zum Reagenz zugesetzt und darauf werden zur Lösung noch 0,5g NH_4Cl zugefügt.

5. Bestimmung der Glukoseaufnahme

Die Bestimmung der Glukoseaufnahme wurde kolorimetrisch nach der Methode von FOLIN und WU (1929) durchgeführt. An Hand einer vorher aufgestellten Eichkurve konnte die Glukosekonzentration in einem Bereich von 20 - 500 mg/100ml abgelesen werden. Die Messung erfolgte gegen das glukosefreie Reagenz im Photometer bei 740 nm.

6. Messung der photosynthetischen O_2 -Entwicklung und des O_2 -Verbrauchs durch die Atmung

Die Messung des Gaswechsels erfolgte manometrisch. Zur Messung der photosynthetischen O_2 -Entwicklung wurden zumeist 20 ml Algensuspension in einer Servall-Zentrifuge schonend abzentrifugiert (3 min bei Stufe 80) und mit 5 ml Überstand + 5 ml 0,1 M Carbonatpuffer aufgenommen. Davon gelangten 2 Parallelproben mit je 4 ml Suspension zur Messung. Die O_2 -Entwicklung wurde über eine Zeitspanne von 90 min im Abstand von 10 min abgelesen. Zur Atmungsmessung wurden ebenfalls 20 ml abzentrifugiert und mit 6 ml Überstand aufgenommen. Davon wurden je 2,5 ml Suspension in 2 Parallelgefäße pipettiert. In die seitlichen Ansatzbirnen wurden 0,5 ml 2% Glukoselösung eingebracht. Der Mitteleinsatz enthielt 0,2 ml 10% KOH mit einem Papierstreifen. Die Reaktionsgefäße wurden mit Alufolie abgedunkelt, und nach kurzer O_2 -Begasung wurde die Grundatmung über 20 min beobachtet. Alsdann wurde die Glukoselösung eingekippt und der O_2 -Verbrauch im Abstand von 10 min abge-

lesen.

Alle Warburg-Versuche wurden mehrmals wiederholt.

III. ERGEBNISSE

A. VERÄNDERUNGEN DER PIGMENTGARNITUR BEI PHYSIOLOGISCHEM STICKSTOFFMANGEL

1. Auftreten des Sekundärcarotinoids (SC) Astacin in 3 verschiedenen Estern

Kultiviert man *Ankistrodesmus* in einem N-freien Medium im Licht, so nimmt diese Kultur alsbald eine gelb-grüne Färbung an (die Kultur "bleicht" aus). Das Chlorophyll und die Primärcarotinoide verschwinden nach und nach, wogegen das Astacin als sogenanntes Sekundärcarotinoid (SC) in seiner Menge fortlaufend zunimmt. Die N-Mangelkulturen sehen schließlich nach 40 - 50 Tagen Kulturdauer leuchtend orange aus. Die Normalkontrolle bleibt bei ausreichender Nitratversorgung auch über einen langen Zeitraum astacinfrei.

Bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung des Pigmentextraktes einer N-Mangelkultur erscheint das Astacin in 3 Banden P_1 , P_2 und P_3 mit verschiedenem R_f -Wert. Abb. 3 zeigt ein Dünnschichtchromatogramm der Pigmentextrakte einer Normal- und einer Mangelkultur.

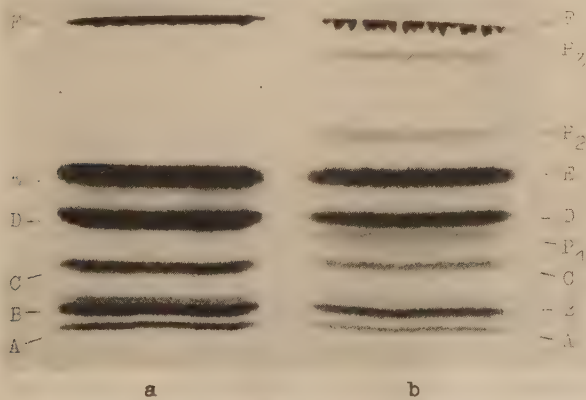


Abb. 3: Chromatogr. Auftrennung der Pigmentextrakte einer Normal- (a) und einer N-freien Kultur (b) auf Dünnschicht A. Pigmentbanden A-F wie in Abb. 1, S.4. P_1 , P_2 , P_3 : Astacinester.

In der zeitlichen Entwicklung erscheint zunächst P_1 , dann in immer stärkerem Maße P_2 und P_3 . Im extremen Mangelzustand dominiert P_3 . TISCHER (1944) stellte bei seinen Untersuchungen an *Haematococcus* pl. fest, daß der Hauptanteil des "roten Farbstoffes" aus 3 verschiedenen Fettsäureestern des Astaxanthins besteht. Inzwischen haben mehrere Autoren das Vorkommen von SC in Form von Fettsäureestern beschrieben. (TISCHER 1944; KESSLER und CZYGAN 1965; VIALA 1966; KLEINIG 1967; KLEINIG und EGGER 1967; CZYGAN 1968a). Es war naheliegend, daß auch die 3 roten Banden P_1 , P_2 und P_3 3 verschiedene Ester des Astacins darstellen. Durch Verseifung und vergleichende Chromatographie mit unverseiften Proben konnte dies bestätigt werden. Wie aus Abb. 4 hervorgeht, wandert das verseifte Gemisch von P_1 , P_2 und P_3 als einheitliche Zone zwischen P_1 und P_2 . Aus Spur 3 ist zu ersehen, daß keine der 3 Banden im nativen Zustand unverestert vorliegt.

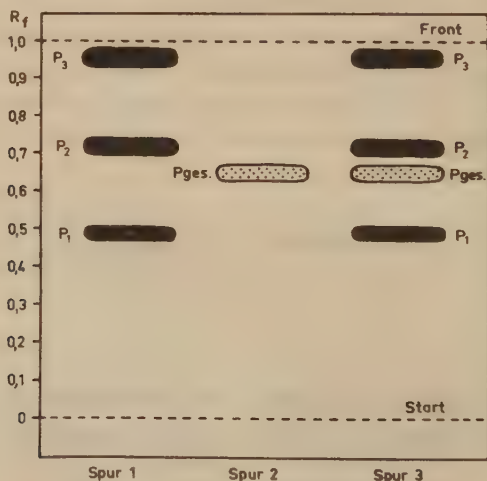


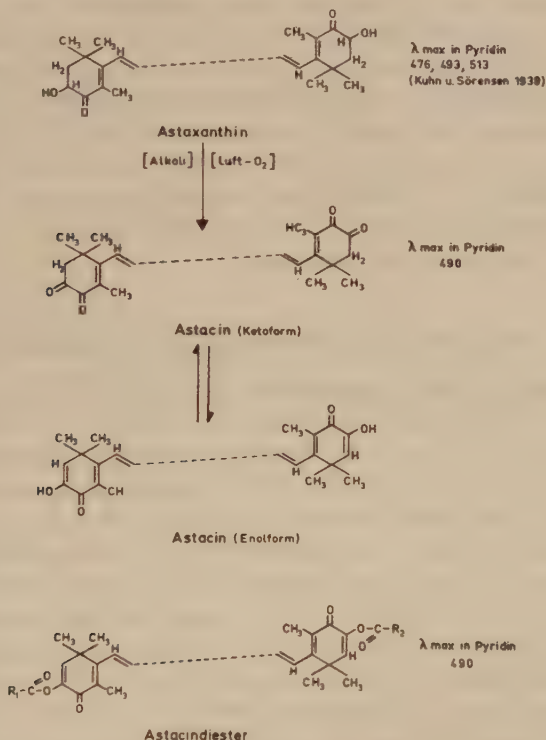
Abb. 4: Trennung der Astacinester in P_1 , P_2 , P_3 und ihrer Verseifungsprodukte auf Dünnschicht A.

Spur 1: Astacinester P_1 , P_2 , P_3

Spur 2: ($P_1+P_2+P_3$) nach Verseifung = P ges.

Spur 3: ($P_1+P_2+P_3$) im Gemisch mit Pges.

Ungeklärt bleibt einstweilen, ob es sich bei den Zonen P_1 , P_2 und P_3 um Ester des Astacins (3, 4, 3', 4'-Tetra-keto- β -carotin) oder des Astaxanthins (3, 3'-Dihydroxy-4, 4'-diketo- β -carotin) handelt. Der Nachweis ist schwierig zu führen, da Astaxanthin eine sehr instabile Verbindung ist und in Gegenwart von Alkali und Luft- O_2 leicht zu Astacin oxydiert:



Bei der Isolierung und Verseifung erhält man daher nur das stabilere Astacin. Im Gegensatz zu anderen Autoren möchten wir aber annehmen, daß im nativen Zustand auch schon das Astacin und nicht das Astaxanthin als Ester vorliegt. Nach KARRER und JUCKER (1948) besitzt nämlich das Astaxanthin in Pyridin ein ausgeprägtes 3-gipfeliges Absorptionsspektrum ($\lambda_{\max}$ 476,

493, 513 nm), wogegen die Pigmente der Zonen P_1 , P_2 und P_3 im selben Lösungsmittel ein breites eingipfeliges Absorptionsspektrum aufweisen, genau wie ihr Verseifungsprodukt Astacin ($\lambda_{\max}$ Pyridin 490 nm). Eine Veresterung des Astacins wäre auch ohne weiteres möglich, sofern dieses in der Enolform vorliegt (s. Formelvorschlag). Die Konjugation der Carbonylgruppe zu den beiden $C = C$ - Doppelbindungen begünstigt das mesomere System, was eine "Verwaschung" der 3 isolierten "peaks" zu einer breiten Absorptionsbande zur Folge hat. Eine solche "Verwaschung" kann aber kaum durch das Anhängen von Fettsäuren zustande kommen, da durch die Veresterung keine Erweiterung der Mesomerie erreicht wird. Verestertes Astaxanthin sollte daher ebenfalls ein 3-gipfeliges Absorptionsspektrum aufweisen. Wir bezeichnen deshalb das Sekundärcarotinoid von Anki-strodesmus als Ester des Astacins.

2. Kinetik der Primärpigmentabnahme und Astacinbildung

Über den Einfluß des N-Mangels auf den Pigmentgehalt grüner Pflanzen ist wiederholt berichtet worden, doch gibt es nur wenige Arbeiten die diese Erscheinung quantitativ untersuchen. AACH (1953) studierte den Abbau der Chloroplastenfarbstoffe bei *Chlorella pyrenoidosa* unter N-Mangel, indem er den Gehalt an Chlorophyll a und b, Gesamtcarotin und Gesamt-xanthophyll pro Einzelzelle über einen Zeitraum von 57 Tagen bestimmte. DERSCH (1960) untersuchte den zeitlichen Verlauf derselben Pigmentfraktionen an SC-bildenden Grünalgen. Als Bezugsgröße wählte er mg Pigment / 100 ml Algensuspension. Der Quotient Gesamtchlorophyll : Gesamtprimär-carotinoide soll außerdem den "Grad des Stickstoffmangels" anzeigen. Als eine Art halbquantitative Untersuchung ist die Arbeit von SESTAK et al. (1963) aufzufassen, in welcher papierchromatographisch die Farbsintensitäten der Pigmente alternder Kulturen verschiedener *Chlorococcales* mit Normalkulturen verglichen werden.

Neue Trennmethoden erlaubten uns, die durch Stickstoffmangel bedingten Mengenänderungen der Pigmente auch bei den Xanthophyl-

len zu analysieren. Dies war insbesondere im Hinblick auf die Untersuchungen zur Biogenese des Astacins wichtig.

Abb. 5 zeigt die Kinetik der Primärpigmentabnahme und Astacinneusynthese über einen Zeitraum von 33 Tagen.

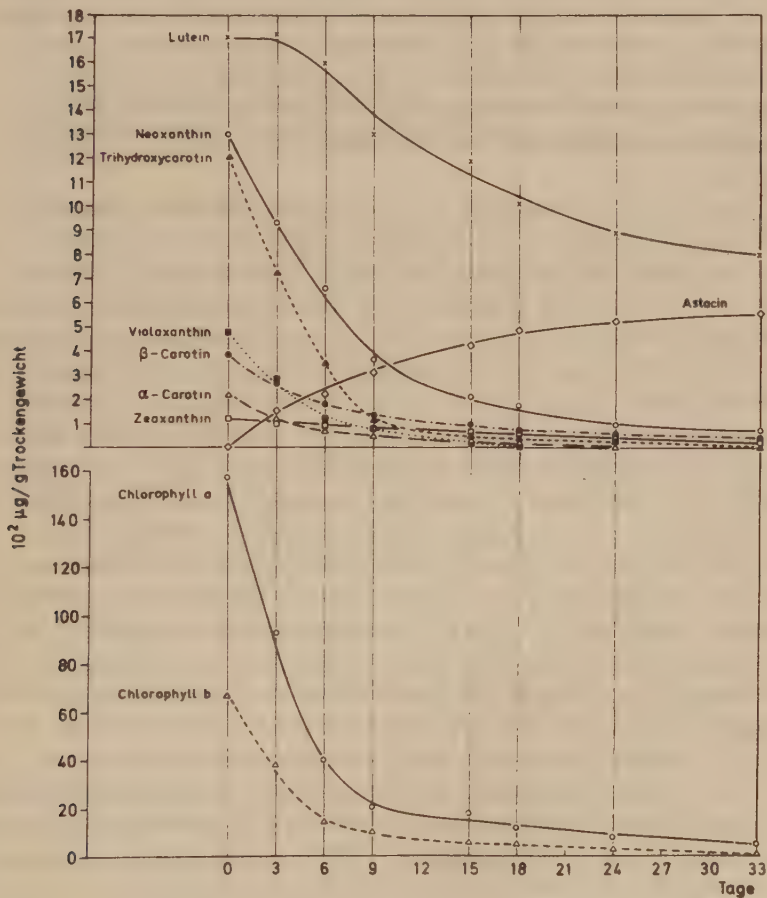


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der Primärpigmentabnahme und Astacinneubildung in einer N-Mangelkultur

Da es hierbei weniger auf stöchiometrische Aussagen als vielmehr auf Vergleiche des zeitlichen Verlaufs der Carotinoidmengenänderungen ankam, wählten wir trotz der unter 3.3. a) besprochenen Mängel als Bezugsgröße das Trockengewicht. Diese Art der Darstellung erlaubt zwar nur das Ablesen des jeweilig herrschenden Verhältnisses von Pigmentmenge zur Trockensubstanz, ermöglicht es aber andererseits, verschiedene Kulturen in ihrem "Grad des Stickstoffmangels" signifikanter zu vergleichen als bei Verwendung des von DERSCH (1960) benutzten, wenig besagenden Quotienten Gesamtchlorophyll : Gesamtcarotinoide.

Wie den Kurven zu entnehmen ist, wird die Hauptmenge der Primärpigmente bereits in den ersten 10 Tagen unter der Einwirkung des N-Mangels abgebaut. Da die Trockensubstanz in dieser Zeit noch nicht durch verstärkte Produktion von Lipiden besonders vermehrt wird, entspricht der Verlauf der Kurven weitgehend dem tatsächlichen Abbau der Pigmente. Was den Verlust des Chlorophylls betrifft, so ist zu beachten, daß der Abbau etwa ab dem 10. Kulturtage nur noch sehr langsam vor sich geht. Selbst in mehrere Monate alten Mangelkulturen finden sich noch quantitativ bestimmbare Mengen an Chlorophyll a. Wir halten es für wichtig darauf hinzuweisen, daß gezeigt werden konnte, daß die parallel zum Abbau der Primär-carotinoide verlaufende Neusynthese des Astacins in Lichtkulturen streng an die Photosynthese gebunden ist. Wie ein späterer Versuch zeigen wird, ist die photosynthetische O_2 -Entwicklung bezogen auf das Chlorophyll in chlorophyllarmen N-Mangelkulturen höher als in Normalkulturen, was für eine Schonung des photosynthetisch aktiven Chlorophylls während des Abbauprozesses spricht. Von den Primär-carotinoiden zeigen das Neoxanthin und Trihydroxycarotin die auffälligsten Mengenabnahmen. Letzteres wird wegen seiner besonderen Mengenlabilität als potentielle Vorstufe des Astacins diskutiert.

Am wenigsten spricht eigentümlicherweise das Lutein auf N-Mangel an. Es ist selbst in extremen, orange-roten Mangelkulturen noch mit einer stattlichen Menge vertreten. Die von AACH (1953)

und DERSCH (1960) gemessene Xanthophyllfraktion besteht also in älteren Mangelkulturen nur aus Lutein, da die übrigen Xanthophylle nahezu vollständig verschwinden. In etwa 45 Tage alten N-freien Kulturen lassen sich nur noch folgende Pigmente quantitativ bestimmen: Astacin, Lutein, Chlorophyll a und geringe Mengen an β -Carotin.

3. Pigmentrestitution bei Aufhebung des Stickstoffmangels und Verschiebung der Pigmentmengenverhältnisse während der Restitution

Daß mehrere Monate alte, nahezu chlorophyllfreie N-Mangelkulturen von Ankistrodesmus in der Lage sind, nach N-Zugabe wieder zu ergrünen, wird von mehreren Autoren berichtet (AACH 1953; BRÜGGEMANN 1954; DERSCH 1960). Diese Tatsache beweist, daß durch langwährenden N-Entzug keine Letalschädigung erfolgt. Um auch hier Aufschluß über Dauer und Verlauf der Pigmentneubildung nach N-Zugabe zu erhalten, erfaßten wir die gesamte Pigmentrestitution in einer Kinetik. In Abb. 6 ist die Resynthese der einzelnen Primärpigmente wiedergegeben. Gleichzeitig erfolgt ein Abbau des Astacins. Bereits nach 65 Std. sind die Kulturen voll ergrünt und von Normalkulturen rein äußerlich nicht mehr zu unterscheiden. Auffällig ist, daß die Neogenese des Chlorophylls b weit hinter der des Chlorophylls a zurückbleibt. Während in Normalkulturen ein Mengenverhältnis von Chlorophyll a zu b von etwa 2,5 : 1 vorliegt, beträgt hier das Verhältnis 4,3 : 1. Eine ebenso auffällige Verschiebung der Pigmentmengenverhältnisse kann bei der Resynthese der Primärcarotinoide beobachtet werden. Die unter N-Mangel mengenmäßig am stärksten abnehmenden Xanthophylle Neoxanthin und Trihydroxycarotin weisen in Restitutionskulturen auch die größte Zunahme auf. Von allen Primärcarotinoiden zeigt dabei das Trihydroxycarotin die höchste Bildungsgeschwindigkeit und übergipfelt sogar nach 65 Std. Restitutionsdauer mengenmäßig das Lutein, welches in Normalkulturen den Hauptanteil der Xanthophylle ausmacht. Aus dieser Beobachtung könnten sich gewisse Konsequenzen für die Biogenese der

Kanthophylle ergeben, auf welche in der an diesen Hauptabschnitt sich anschließende Diskussion eingegangen werden soll.

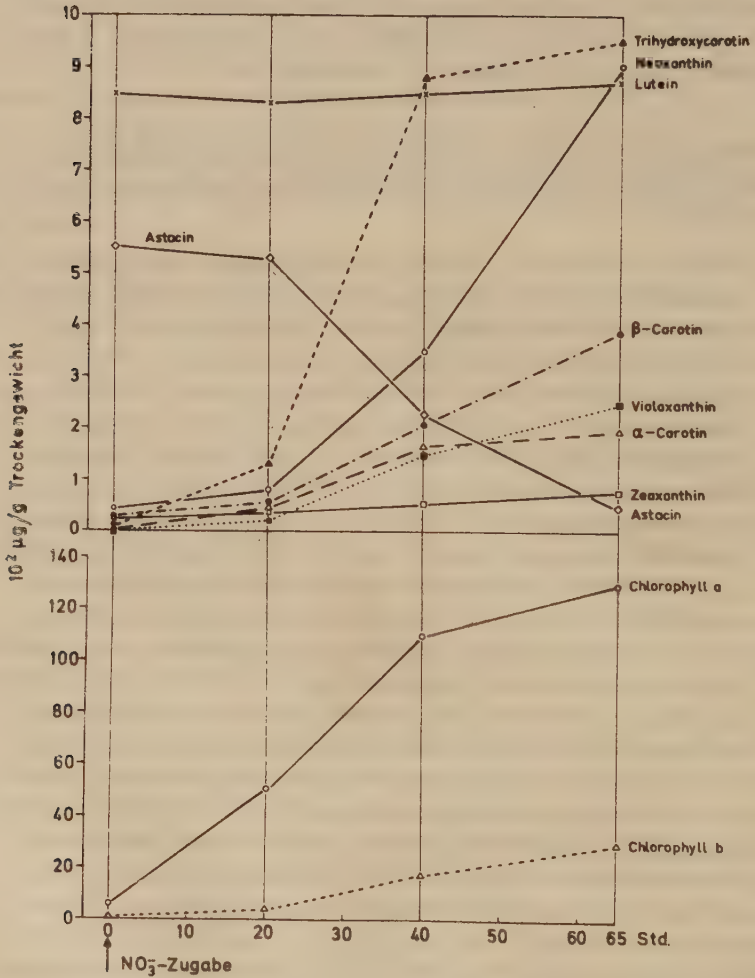


Abb. 6: Restitution der Primärpigmente und Astacinabbau nach Überführung einer N-Mangelkultur in N-haltiges Medium

4. Versuche zur Lokalisation der Astacinester in der Zelle

Da das Astacin als einziges Carotinoid in N-Mangelzellen von *Ankistrodesmus* verestert wird, erhebt sich die Frage, ob der Vorgang der Veresterung eventuell an eine besondere Zellstruktur gebunden ist. Nimmt man an, daß das Astacin ebenso wie die Primärcarotinoide in den Thylakoiden lokalisiert ist, so wäre zu erwarten, daß auch einige der Primärxanthophylle mit freien OH-Gruppen im Zuge der verstärkten Fettsäuresynthese verestert werden müßten. Dies ist aber selbst in extremen Mangelzustand nicht der Fall. Es besteht daher Grund zu der Annahme, daß der Vorgang der Veresterung nicht in den Thylakoiden stattfindet, sondern außerhalb dieser. Das würde bedeuten, daß die Astacinester nicht an die Lamellarstrukturen gebunden sind, sondern in besonderen Partikeln lokalisiert sein müßten. DROOP (1954) berichtet über die Lokalisierung des Haematochroms in *Haematococcus* pl., welches mit Astacinestern identisch ist, daß dieses in Öltröpfchen gelöst zwischen dem parietalen Chromatophor und dem Nucleus lagert. Wie den Feinstrukturuntersuchungen von KLEINIG und WRISCHER (1968) an *Acetabularia*-Chloroplasten zu entnehmen ist, zeigen diese im Zustand der Sekundärcarotinoidbildung eine aufgelockerte Lamellarstruktur mit globulären osmiophilen Einschlüssen. Bezugnehmend auf die Untersuchungen von LICHTENTHALER und SPREY (1966) werden diese Einschlüsse auch als Plastoglobuli bezeichnet. KLEINIG und WRISCHER schließen aus der Rotfärbung dieser Globuli, daß in ihnen die SC deponiert sein könnten.

Von mehreren anderen Autoren wird über das Vorkommen osmiophiler Globuli in degenerierten Chloroplasten höherer Pflanzen (LJUBESIC 1968; ROUX et al. 1968) oder in Chromoplasten von Früchten und Blütenblättern (HARRIS and SPURR 1969; LICHTENTHALER 1968) berichtet. Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen von MAYER (1969) und MAYER und CZYGAN (1969) an *Ankistrodesmus*zellen geht hervor, daß diese bei N-Mangel nur eine geringe Zahl relativ kleiner osmiophiler Globuli bilden. Nach Ansicht dieser Autoren sollen die SC von *Ankistrodesmus* nicht

in den intraplastidären Globuli lokalisiert sein, sondern in den viel größeren Lipidvakuolen außerhalb der Plastiden. Ein speziell zu dieser Frage durchgeführter Versuch sollte darüber näheren Aufschluß geben.

30 Tage alte N-Mangelkulturen von *Ankistrodesmus* wurden in 10^{-3} M Phosphatpuffer mittels Glasperlenhomogenisator aufgebrochen und zum weiteren Aufschluß 2 min im Sonifier mit Ultraschall behandelt. Die so gewonnenen Zellpartikel wurden erneut osmotisch aufgebrochen. Durch anschließende Ultrazentrifugation bei $105\ 000 \times g$ (1 Std. bei 4°C) wurden schließlich die Chloroplastenfragmente von einer durch Astacin rotgefärbten Lipidschicht im Überstand abgetrennt. In Abb. 7 sind die Mengenanteile in % der Gesamtcarotinoidmenge an Astacin und Primäracarotinoiden im Überstand und Sediment dargestellt.

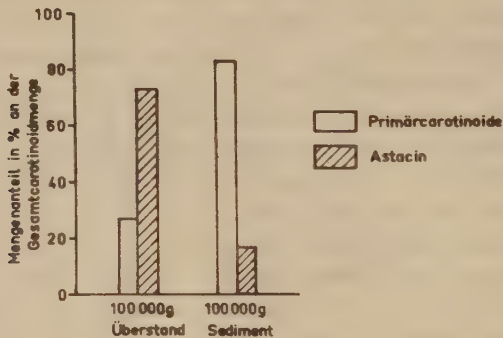


Abb. 7: Verteilung von Primäracarotinoiden und Astacin nach Ultrazentrifugation aufgeschlossener Zellen einer N-Mangelkultur

Der hohe Anteil an Astacin in der roten Lipidschicht auf der Flüssigkeitsoberfläche des Überstandes (73% der Gesamtcarotinoidmenge im Vergleich zu nur 17% im Sediment), läßt darauf schließen, daß ähnlich wie in *Haematococcus* auch in *Ankistrodesmus* die Astacinester in außerhalb des Chloroplasten gelegenen Zelleinschlüssen akkumuliert sind.

Dagegen wäre eventuell einzuwenden, daß sich die Astacinester auch nach einer möglichen Freisetzung aus Thylakoiden nachträglich in den Lipiden gelöst haben könnten. Träfe dies zu, so müßte das ebenso lipophile Carotin mit einem ebenfalls größeren Mengenanteil im Überstand auftreten. Wie jedoch aus nachstehender Tabelle zu entnehmen ist, ist dies nicht der Fall.

Mengenanteil in % der Gesamtcarotinoidmenge

	Überstand	Sediment
Astacin	73	17
Gesamtcarotin	0,5	2,3

5. Kurze Diskussion

Feinstrukturuntersuchungen an assimilierendem Gewebe haben ergeben (EGLE 1960), daß der Pigmentabbau bei Alterung und N-Mangel von einer allgemeinen Disintegration und partiellen Einschmelzung der Lamellarstrukturen begleitet wird. Dasselbe beobachteten KLEINIG et al. (1968) und MAYER et al. (1969) während der SC-Bildung in den Chromatophoren von Grünalgen. Im Zuge akuten N-Mangels erfolgte eine rigorose Einschmelzung der Strukturproteine, wobei die Zahl der Thylakoide stark reduziert wird und globuläre Lipideinschlüsse auftreten.

Diese morphologischen Veränderungen in den Algenchromatophoren können im unmittelbaren Zusammenhang mit dem Abbau der Primärcarotinoide stehen. Als Ursache für den Verlust des Chlorophylls muß vorallem ein Mangel N-haltiger Vorstufen (Glycin) für die Chlorophyllneusynthese angesehen werden. LJUBEŠIĆ (1968) stellte fest, daß während des Vergilbens von Blättern zunächst die Stromathylakoide verschwinden, wogegen die Granathylakoide noch erhalten bleiben. Trotzdem war aber der Chlorophyllgehalt schon auf 50% abgesunken. Während also der allmähliche Abbau des Chlorophylls als unmittelbare Folge

des N-Mangels zu verstehen ist, muß für den Verlust der Primär-carotinoide ein zusätzliches Prinzip auf der Basis der morphologischen Veränderungen im Chromatophor wirksam sein.

Wie LJUBIŠIĆ durch elektronenmikroskopische Aufnahmen weiterhin beobachten konnte, findet im späten Vergilbungsstadium schließlich auch ein Zerfall der Granathylakoide statt, der durch Perforation, Aufblähungen und Fragmentierungen eingeleitet wird. Man könnte sich nun leicht vorstellen, daß im Zuge dieser allgemeinen Auflösungserscheinungen die frei werdenden Primär-carotinoide entweder nach Art einer β -Oxydation abgebaut (BLAIN 1963) oder durch katalytischen Kontakt mit einer Oxygenase zu Astacin oxydiert werden. Da gleichzeitig während des N-Mangelzustandes verstärkt Fettsäuren produziert werden, können die OH-Gruppen des nunmehr freiliegenden SC leicht verestert werden. Das dadurch stark lipophil gewordene Astacin wird schließlich zusammen mit anderem Lipidmaterial in Form von Plastoglobuli oder sogenannten Lipidvakuolen kompartimentiert.

Wie den zur Frage der Astacinbiogenese durchgeführten Versuchen (S. 72) zu entnehmen ist, könnte dabei das Trihydroxycarotin mit seinen 3 OH-Gruppen als unmittelbare Vorstufe des Astacins angesehen werden. Dafür sprechen auch die Befunde von STRANSKY (1969), wonach das Trihydroxycarotin bisher nur in solchen Algen gefunden wurde, die auch die Fähigkeit zur SC-Synthese besitzen. Das schnelle Wiederergrünen nach N-Zugabe zu Mangelkulturen ist mit einem Wiederaufbau der Thylakoide verbunden. Der Kontakt des Trihydroxycarotins zur hypothetischen Oxygenase wird damit unterbrochen und es kommt zu einem augenblicklichen Anstau dieses Pigments, so wie es die Restitutionskinetik in Abb. 6 zeigt. Zum Schluß sei noch bemerkt, daß der Luteinpool in der beobachteten Zeitspanne kaum auf N-Zugabe reagiert. Dies veranlaßt zu der Annahme, daß das Lutein in der Biogenese der Xanthophylle offenbar als ein Endprodukt aufgefaßt werden muß, welches ähnlich wie die Stärke im Stoffwechsel der Zucker nur sehr träge auf Ab- und Bauprozesse reagiert. Die leichte Beeinflußbarkeit des Pig-

mentgehalte durch den Außenfaktor Stickstoff böte somit eine gute Möglichkeit, die Biosynthese der Xanthophylle mittels Isotopenmarkierung zu studieren.

6. Zusammenfassung

1. In N-Mangelkulturen erscheint ein rötliches Sekundärcarotinoid, das aus 3 verschiedenen Estern des Astacins besteht.
2. Unter N-Mangel nehmen alle Primärpigmente mehr oder weniger stark ab. Parallel zu dieser **Abnahme** verläuft die Neubildung des Astacins.
3. Orangefarbene, etwa 45 Tage alte Mangelkulturen enthalten nur mehr die Pigmente Astacin, Lutein und geringe Mengen an β -Carotin und Chlorophyll a.
4. Nach N-Zugabe zu N-Mangelkulturen erfolgt mit unterschiedlicher Bildungsgeschwindigkeit eine Restitution der Primärpigmente, wobei das Astacin wieder abnimmt. Der Wiederergrünungsprozess ist nach 65 Std. abgeschlossen.
5. Während der Pigmentneogenese findet eine Verschiebung in den Pigmentmengenverhältnissen statt, wobei im Vergleich zu Chlorophyll b das Chlorophyll a besonders zunimmt und unter den Carotinoiden besonders das Trihydroxycarotin.
6. Astacin ist als einziges Xanthophyll verestert. Es könnte wahrscheinlich gemacht werden, daß die Astacinester außerhalb der Thylakoide lokalisiert sind.
7. Das Trihydroxycarotin wird auf Grund seiner 3 OH-Gruppen und seiner empfindlichen Reaktion auf N-~~Entzug~~ bzw. N-Zugabe, als mögliche Vorstufe des Astacins diskutiert.

B. INDUKTION DER ASTACINBILDUNG IN N-HALTIGEN NORMALKULTUREN BEI KULTIVIERUNG IN SAUREM NÄHRMEDIUM

1. Einleitung

Chlorella zofingiensis bildet unter N-Mangel Canthaxanthin und Astaxanthinester. Dieselbe Erscheinung beobachteten KESSLER und CZYGAN (1965) auch bei Anwesenheit von Nitratstickstoff, wenn das Nährmedium einen pH-Wert von 5-6 aufwies. KLEINIG (1967) beobachtete ebenfalls eine SC-Bildung in der Grünalge *Sphaeroplea* bei Kultivierung in saurem Nährmedium. Es schien uns daher interessant festzustellen, ob die Astacinbildung auch in *Ankistrodesmus* bei Kultivierung in N-haltigem Medium durch Absenkung des pH's induziert werden kann. Ferner sollte untersucht werden, wie die Auslösung der SC-Bildung durch Absenkung des p_H -Wertes im Nährmedium zu erklären ist.

2. Auftreten von Astacin bei Kultivierung in saurem Nährmedium

Kultiviert man *Ankistrodesmus* in N-haltigem Nährmedium bei pH 3,5 über einen Zeitraum von etwa 5 Tagen bei pH 3,5, so treten vergleichsweise hohe Mengen an Astacin in P_1 und P_3 auf (Abb. 8). Eine über dem Chlorophyll a oft erscheinende Zone von Phaeophytin zeigt den sauren Einfluß an. Bereits nach verhältnismäßig kurzer Kulturdauer (66 Std.) in diesem sauren Nährmedium entstehen beachtliche Mengen an Astacin, die fast das Doppelte der N-freien Kontrolle betragen. In Abb. 8 sind die Astacinmengen einer N-freien Kultur und einer N-haltigen Kultur von pH 3,5 gegenübergestellt. Normalkulturen stellen außerdem bei Kultivierung in saurem Nährmedium die Vermehrung ein, wogegen sich die Zellen N-freier Kulturen noch über einen gewissen Zeitraum weiter teilen. Dementsprechend erreicht die Astacinmenge in sauren Kulturen bald einen bestimmten Maximalwert. Bei anhaltender Dauerkultur in saurem Nährmedium sterben die Zellen schließlich ab. 5 Tage alte pH 3,5 Kulturen zeigen allerdings noch keine Anzeichen einer Letalschädigung. Über-

führt man diese nämlich wieder in ein neutrales Nährmedium, so wird das Astacin rückgebildet und die Zeller beginnen wieder, sich zu teilen. Die Kultivierung von *Ankistrodesmus* in einer stark basischen Nährlösung führt zu keiner Astacinbildung.

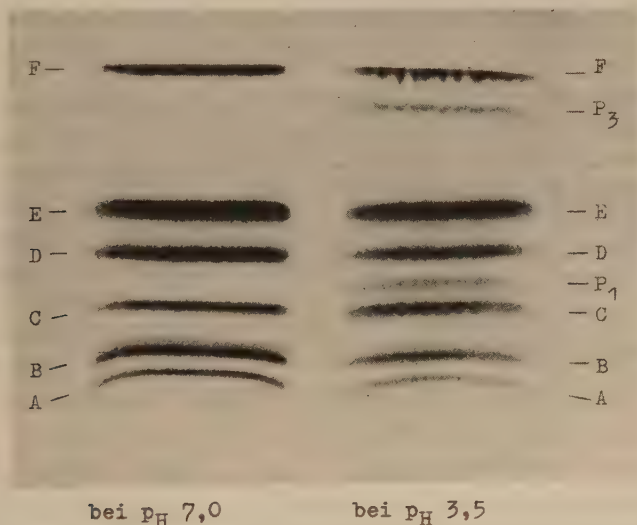


Abb. 8: Chromatogramm der Pigmentextrakte von N-haltigen Kulturen nach 5 Tagen Kulturdauer in neutralem (pH 7,0) bzw. saurem (pH 3,5) Medium. Dünnschicht A.



Abb. 9: Astacinmengen einer Normalkultur von pH 3,5 und einer N-freien Kontrolle von pH 6,9 nach 5 Tagen Kulturdauer

3. Versuche zur Aufklärung der Aciditätswirkung auf die Astacinbildung

3.1. p_H -Werte des Zellhomogenats N-haltiger und N-freier Kulturen

Die Auslösung der SC-Bildung durch die Erniedrigung des p_H -Wertes in normal N-haltigen Kulturen legte die Vermutung nahe, daß als eigentliche Ursache der SC-Bildung eventuell eine intrazelluläre p_H -Änderung in Frage kommen könnte. Astacinbildende Zellen N-freier Kulturen sollten daher in ihrem Inneren ein saureres Milieu aufweisen als Zellen von Normalkulturen. Einen Aufschluß darüber sollte die Überprüfung der p_H -Werte der Zellhomogenate N-haltiger und N-freier Kulturen erbringen. Zu diesem Zweck schlossen wir die Zellen nach verschiedenen Verfahren auf und bestimmten den p_H -Wert.

Methode:

Die Zellen einer Normalkultur und einer etwa 10 Tage alten N-freien Kultur wurden abzentrifugiert, zweimal mit aqua dest. gewaschen, mit wenig aqua bidest. aufgenommen und nach folgenden Methoden aufgebrochen:

1. Kochen, ca. 3 min.
2. Wiederholtes Ausfrieren in einer CO_2 -Schnee/Isopropanol-Kältemischung.
3. Zerschallen mittels Sonifier, 4 min.

In nachstehender Tabelle sind die gemessenen p_H -Werte der Zellhomogenate wiedergegeben:

	p_H -Werte nach		
	Kochen	Ausfrieren	Zerschallen
Zellen in N-haltigem Nährmedium	6,6	5,2	5,3
Zellen in N-freiem Nährmedium	5,6	4,7	4,3
p_H - Differenz	1,0	0,5	1,0

Wie zu ersehen ist, liegen die p_H -Werte der N-freien Kultur bis zu einer ganzen Einheit niedriger als die der N-haltigen Kultur.

3.2. Mengenverhältnisse von Violaxanthin:Zeaxanthin als Kriterium der Aciditätswirkung

Eine weitere Möglichkeit eine intrazelluläre p_H -Erniedrigung nachzuweisen, ergibt sich aus der Gleichgewichtslage des Xanthophyllcyclus. Die Bildung von Zeaxanthin aus Violaxanthin findet bei einer Erniedrigung des p_H -Wertes in Chloroplasten auf Werte um 5 statt. Im Normalfall wird eine solche p_H -Erniedrigung und Zeaxanthin-Bildung durch Licht hervorgerufen. Sie ist aber auch im Dunkeln zu induzieren, wenn der p_H -Wert in den Zellen erniedrigt wird (verschiedene Möglichkeiten dafür siehe HAGER 1969).

Falls also N-Mangel tatsächlich eine reelle p_H -Erniedrigung in den Zellen hervorruft, so sollten N-freie Kulturen bei Dunkelanzucht größere Mengen an Zeaxanthin beinhalten als die N-haltigen Kontrollen.

Aus einer einheitlichen Zellsuspension wurden 3 verschiedene Dunkelkulturen mit Glukosezusatz angesetzt, nämlich

mit N, p_H 7,0
ohne N, p_H 7,0
mit N, p_H 3,5

und auf p_H -Konstanz während der 6-tägigen Kulturdauer überwachet. Danach wurden die prozentualen Anteile von Violaxanthin und Zeaxanthin an der Gesamtcarotinoidmenge bestimmt und in nachstehender Tabelle vergleichend gegenübergestellt.

	Mengenanteil in % der Gesamtcarotinoidmenge		
	mit N, p_H 7,0	ohne N, p_H 7,0	mit N, p_H 3,5
Violaxanthin	13,5	7,4	3,9
Zeaxanthin	6,5	38,3	18,3

Die Ergebnisse bestätigen, daß in den Zellen N-freier Kulturen ein saures Milieu vorhanden sein muß, denn der Zeaxanthinanteil ist in diesen bei gleichem Außen-pH um ein Vielfaches höher als in der N-haltigen Kultur. Die N-haltige Kultur weist - wie zu erwarten war - nur geringe Mengen an Zeaxanthin auf, da bei pH 7,0 zur Zeaxanthinbildung Licht erforderlich ist. In der N-freien pH 7,0-Kultur muß daher anhaltend ein niedriger pH-Wert wirksam gewesen sein, so daß keine Rückumwandlung stattfinden konnte, die normalerweise nach Abschalten des Lichtes in neutralem Milieu sofort einsetzt. Der hohe Zeaxanthinanteil in der N-haltigen pH 3,5-Kultur beweist seinerseits, daß eine Mitteilung des Außen-pH in das Zellinnere tatsächlich möglich ist.

Die oben gestellte Frage, ob eine stoffwechselphysiologisch bedingte p_H -Erniedrigung in der Zelle in ursächlichem Zusammenhang mit der SC-Bildung steht, sollte sich durch eine von außen erzwungene p_H -Erniedrigung im Innern der Zelle klären lassen.

3.3. Einfluß der Acidität auf N-freie Kulturen

Wenn eine Absenkung des p_H -Wertes im Zellinnern als Ursache für die SC-Bildung zutrifft, so müßten N-freie Kulturen bei p_H 3,5 in noch stärkerem Maße Astacin bilden als bei p_H 7,0. Wie aber aus dem Verlauf der Astacinbildung in diesen beiden Kulturen zu entnehmen ist (Abb. 10), ist dies nicht der Fall. Die Astacinbildung in der p_H 3,5-Kultur ist zwar anfangs größer als in der p_H 7,0-Kultur, bleibt aber bald gegenüber dieser zurück. Die Erniedrigung des p_H -Wertes im Zellinnern ist daher als eigentliche Ursache der SC-Bildung nicht sehr wahrscheinlich.

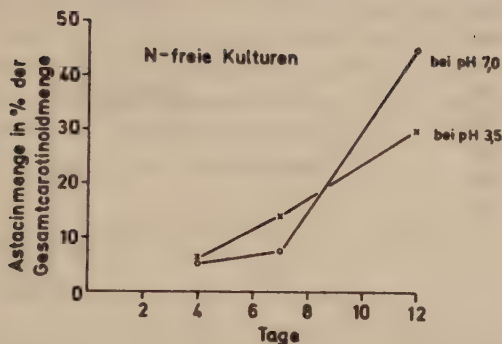


Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der Astacinbildung bei Absenkung des p_H -Wertes im Nährmedium N-freier Kulturen

3.4. Blockierung der Nitrataufnahme durch niederes Außen-pH

ANDKEENKO und ALEKHINA (1966) berichten, daß bei Kultivierung von Getreidepflanzen in einem Nährmedium von pH 4,0 der Aminosäurestoffwechsel unterbrochen ist. Einbauversuche mit ^{15}N ergaben, daß die direkte Aminierung blockiert ist. Für die Diskussion der Säurewirkung auf die SC-Bildung schien es uns wichtig, zu wissen, inwieweit die Erhöhung der H^+ -Ionenkonzentration im Kulturmedium einen Einfluß auf die Nitrataassimilation besitzt. Nach den Untersuchungen von KESSLER und CZYGAN (1965) werden nämlich bei p_H 4-5 die Aktivitäten der Nitrat- und Nitritreduktase in *Chlorella zofingiensis* herabgesetzt. Abb. 11 zeigt die Kinetik der Nitrataufnahme bei Lichtkulturen von p_H 7,0 und 3,5.

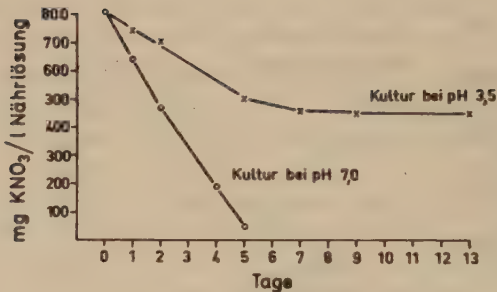


Abb. 11: Blockierung der Nitrataufnahme durch Absenkung des pH-Wertes im Nährmedium

Aus dem Diagramm ist klar zu ersehen, daß die Nitrataufnahme oder die Nitratreduktion in der Zelle unter dem Einfluß der Acidität blockiert wird. Dies führt zu einem N-Mangel in der Zelle und damit zur SC-Bildung, trotz eines normalen Nitratangebots im Nährmedium.

4. Kurze Diskussion

Die eben geschilderten Versuche hatten das Ziel, die Ursachen der SC-Bildung unter dem Einfluß einer erhöhten H^+ -Ionenkonzentration des Nährmediums aufzuklären. Da die Absenkung des pH-Wertes in einer N-freien Kultur keine anhaltende Stimulierung der Astacinbildung im Vergleich zur Neutral-Kontrolle zur Folge hat, muß eine direkte Wirkung der Acidität - etwa durch Mitteilung des Außen-pH an den SC-bildenden Reaktionsort - ausgeschlossen werden. Die Tatsache, daß Zellen N-freier Kulturen intrazellulär ein stärker saures Milieu aufweisen als Normalkulturen (wie durch Messung der pH-Werte des Zellhomoogenats und die pH-abhängige verstärkte Bildung von Zeaxanthin gezeigt werden konnte), kann daher nicht als Ursache für die SC-Bildung angesehen werden. Dafür sprechen auch Versuche im zellfreien

und halbzellfreien System. Obwohl es nicht auszuschließen ist, daß die SC-Bildung durch ein saures Zellmilieu begünstigt wird, kommt als eigentliche Ursache der Aciditätswirkung die Blockierung der Nitrataassimilation in Frage (ANDKEENKO und ALEKHINA 1966; KESSLER und CZYGAN 1965). Die Kulturen geraten dadurch in einen Stickstoffmangelzustand, der nun seinerseits die SC-Bildung veranlaßt.

5. Zusammenfassung

1. Bei Kultivierung von *Ankistrodesmus* in saurem Nährmedium von pH 5,0 - 3,5 erscheint auch in N-haltigen Normalkulturen Astacin in P_1 und P_3 .
2. Die Astacinbildung ist reversibel, wenn die Kulturen wieder in ein neutrales Nährmedium überführt werden.
3. Die Herabsetzung des pH-Wertes des Nährmediums führt bei N-freien Kulturen zu keiner weiteren Steigerung der Astacinbildung.
4. Die pH-Werte der Zellhomogenate N-freier Kulturen liegen um eine ganze Einheit niedriger, als die N-haltiger Kulturen. Ferner haben N-freie Kulturen von pH 7,0 im Vergleich zu N-haltigen Kulturen von pH 7,0 im Dunkelversuch große Mengen an Zeaxanthin, woraus auf eine Erhöhung der Acidität in der Zelle unter N-Mangel geschlossen werden kann. Diese intrazelluläre pH-Verschiebung scheint aber nicht die unmittelbare Ursache für die Astacinbildung zu sein.
5. Die Herabsetzung des pH-Wertes des Nährmediums hat eine Blockierung der Nitrataufnahme zur Folge.
6. Die Induktion der SC-Bildung in N-haltigen Kulturen durch Absenkung des pH's der Nährlösung wird als eine Folge der blockierten Nitrataufnahme und des daraus resultierenden Stickstoffmangels in der Zelle erklärt.

C. INDUKTION DER ASTACINBILDUNG DURCH HEMMSTOFFE DER PROTEIN- UND NUCLEINSÄURESYNTHESE

1. Einleitung

Um weitere Anhaltspunkte darüber zu erhalten, in welcher Weise Stickstoffmangel die SC-Synthese verursacht, versuchten wir herauszufinden, ob zwischen der Biosynthese N-haltiger Verbindungen und der SC-Synthese eine stoffwechselphysiologische Korrelation besteht. Durch Verabreichung von spezifischen Hemmstoffen der Protein- bzw. Nucleinsäurebiosynthese an N-haltige Normalkulturen sollte der Stickstoff-Stoffwechsel unterbrochen und eine Art von Stickstoffmangel nachgeahmt werden. Ziel dieser Versuche sollte es sein, herauszufinden, ob auf diese Weise die Astacinbildung künstlich induzierbar ist und ob sich daraus irgendwelche Erkenntnisse für die Erklärung der N-Mangelwirkung auf die SC-Bildung ableiten lassen. Da sich herausstellte, daß durch bestimmte Hemmstoffe der Protein- bzw. NS-Synthese die Astacinbildung tatsächlich induziert werden kann, stellten wir weitere quantitative Pigmentuntersuchungen an. Dabei wurde vor allem die Frage angegangen, ob die SC durch direkte Umwandlung von Chlorophyllabbauprodukten entstehen, wie CZYGAN (1967) es postuliert.

2. Induktion der Astacinbildung in N-haltigen Kulturen durch Actidion und die Basenanaloga Fluoruracil, Mercaptopurin und Azaguanin

Appliziert man Normalkulturen bestimmte Hemmstoffe der Protein- bzw. NS-Synthese, so erscheint je nach ihrer Wirksamkeit tatsächlich Astacin bereits nach 40 Std. in meßbaren Mengen. Das SC tritt also zeitlich früher und in den ersten Tagen in sogar größeren Mengen auf, als in der N-freien Kontrolle (s. Abb. 13). Gleichzeitig wird die Zellvermehrung eingestellt. Von den erprobten Hemmstoffen erwiesen sich folgende bezüglich der Astacinbildung am wirksamsten: das Antibiotikum

Actidion (Cycloheximid) ($1,4 \times 10^{-5}M$) und die Basenanaloga 5-Fluoruracil ($10^{-3}M$), 8-Azaguanin ($10^{-4}M$) und 6-Mercaptopurin ($3 \times 10^{-3}M$). Abb. 12 zeigt in vergleichender Darstellung ein Verteilungschromatogramm der Pigmente einer N-haltigen Kultur, einer 12 Tage alten N-freien Kultur und einer 8 Tage alten mit Fluoruracil applizierten N-haltigen Kultur.

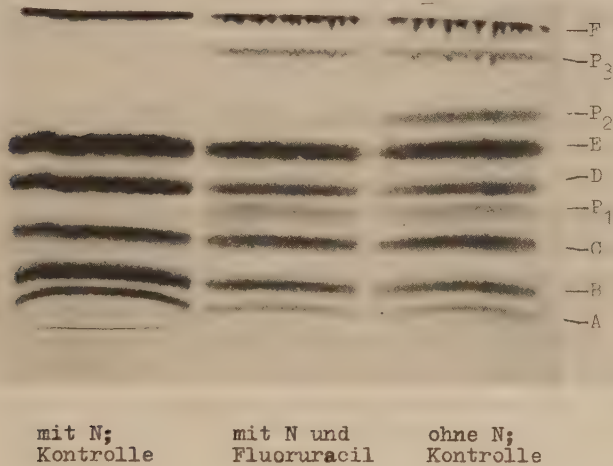


Abb. 12: Auftreten von Astacin P₁ und P₃ in einer N-haltigen Kultur unter Einwirkung von $10^{-3}M$ Fluoruracil. Zum Vergleich 2 Kontrollen mit und ohne N.

Die Astacinester sind sowohl in der N-freien Kontrolle wie in der N-haltigen Fluoruracil-Kultur kräftig entwickelt. P₂ tritt dagegen in der Hemmstoffkultur nur in Spuren auf. Möglicherweise verhindert das Fluoruracil die Bildung der für diesen Astacinester typischen Fettsäuren. Die Hemmeigenschaften der bei unseren Untersuchungen verwendeten Proteinsynthesehemmstoffen sind in zahlreichen Versuchen an pflanzlichem und tierischem Material bereits erprobt worden.

Von Actidion wird angenommen, daß es die Transfer-Reaktion bei der Proteinsynthese hemmt (SCHWEET and HEINTZ 1966; KEY

1966; GROLLMANN 1966). Die Blockierung der Proteinsynthese konnte durch Einbauversuche markierter Aminosäuren auch bei coccalen Grünalgen (MORRIS 1966 a und b und 1967) nachgewiesen werden. Nach KIRK et al. (1965) soll Actidion zwar auch die Chlorophyllsynthese hemmen, nicht aber die Carotinoidsynthese, wie THOMAS et al. (1967) durch Einbauversuche mit $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Mevalonsäure bestätigen konnte. Allerdings hemmt Actidion auch die Carotinoidsynthese, wenn diese lichtinduziert ist, wie HARDING und MITCHELL (1968) bei *Neurospora crassa* nachweisen konnten.

Uneinigkeit herrscht noch darüber, ob der Einbau von Purinanaloga (z.B. 8-Azaguanin, 6-Mercaptopurin) bzw. Pyrimidinanaloga (z.B. 5-Fluoruracil) und die daraus resultierende Bildung abnormer RNS - nachgewiesen durch Einbau ^{14}C -markierter Basenanaloga (CHANTRENNE et al. 1958; HOCHSTER-QUASTEL 1963) - als eigentliche Ursache für die Hemmung der Proteinsynthese anzusehen sind oder die Blockierung der Nucleinsäuresynthese selbst (KEY 1966; deKLOET 1966). Die Hemmwirkung der Basenanaloga auf die Proteinsynthese ist durch Einbauversuche mit ^{14}C -Aminosäuren belegt (CHANTRENNE et al. 1958; HOROWITZ et al. 1960).

3. Zeitlicher Verlauf der Astacinbildung in den Hemmstoffkulturen

In Abb. 13 wurde der zeitliche Verlauf der Astacinbildung in den genannten Hemmstoff-Kulturen im Vergleich zur N-freien Kontrolle zur Darstellung gebracht.

Ogleich die Hemmstoffkulturen mit der normalen Nitratmenge versorgt sind, erscheinen in ihnen bereits nach etwa 40 Std. meßbare Mengen an Astacin. Der Astacingehalt steigt dann weiter an und beträgt z.B. nach 100 Std. Kulturdauer in der mit Mercaptopurin versetzten Kultur 5,2% der Gesamtcarotinoidmenge, wogegen der Astacinanteil in der N-freien Kontrolle nur etwa 1,3% ausmacht. Aus diesen Befunden geht eindeutig

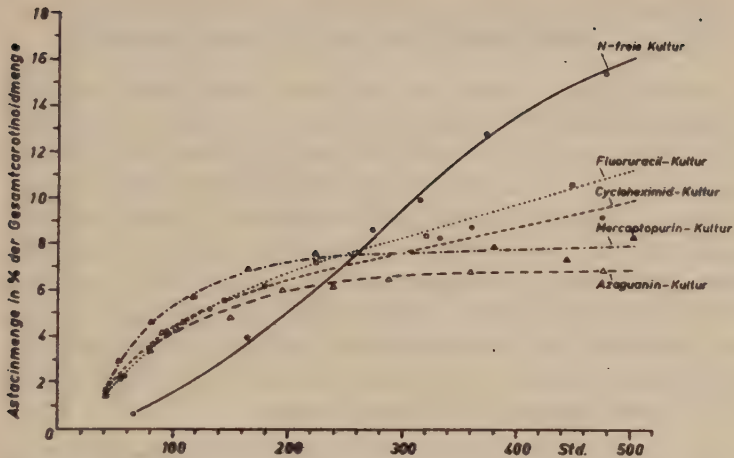


Abb. 13: Kinetik der Astacinentwicklung in den Hemmstoff-Kulturen und in der N-freien Kontrolle

hervor, daß die applizierten Hemmstoffe über die Blockierung der Proteinsynthese die Astacinbildung veranlassen. Nach etwa 220 - 240 Std. (10 - 11 Tage) schneiden die Kurven der Hemmstoff-Kulturen die der N-freien Kontrolle. Im Schnittpunkt beträgt der Astacinanteil zwischen 6 und 7% der Gesamtcarotinoidmenge. Während die Astacinbildung in der N-freien Kontrolle weiterhin ansteigt, flächen sich die Kurven der Hemmstoffkulturen ab. Die SC-Bildung kann also mittels Hemmstoffen der Proteinsynthese nur begrenzt erzwungen werden. Sehr wahrscheinlich üben die verabreichten Hemmstoffe auch nur eine unvollständige Hemmwirkung aus. MORRIS (1966) ermittelte z.B. bei *Chlorella* eine Hemmung der Proteinsynthese durch Actidion von nur 70%, gemessen am Einbau von ^{14}C -Phenylalanin. Immerhin scheint bemerkenswert, daß bei einer auch nur teilweisen Blockierung der Proteinsynthese Astacin entsteht.

4. Quantitative Beziehungen zwischen Primärpigmenten und Astacin in Hemmstoffkulturen und N-freien Kulturen

Die kurzzeitige Induktion der Astacinbildung durch Hemmstoffe der Proteinsynthese erschien uns als gutes Mittel, die wiederholt diskutierte Vermutung einer direkten Umwandlung von Primärpigmenten in SC auf stöchiometrischer Basis näher zu untersuchen. Auf Grund des entgegengesetzten Verlaufs von SC-Bildung und Chlorophyllabnahme soll nach der Vorstellung von CZYGAN (1967) das Chlorophyll als Substrat für die SC-Synthese in Frage kommen. Dabei soll entweder der Porphyrinring oder das Phytol in Isopreneinheiten zerlegt und zum Aufbau von SC benutzt werden. Ein solcher Mechanismus müßte sich bereits in den Mengenverhältnissen zeigen.

In Abb. 14 sind die Mengengerade der einzelnen Pigmentfraktionen bezogen auf das Trockengewicht gegen die Zeit aufgetragen. So beträgt beispielsweise in der Zeitspanne von der 20. bis zur 65. Std. die Chlorophyllabnahme in der Mercaptopurin-kultur $8 \mu\text{Mol/g Tr.gew.}$ und in der N-freien Kontrolle $17 \mu\text{Mol/g Tr.gew.}$

Die Astacin-Neubildung beläuft sich aber im selben Zeitraum in der Mercaptopurin-Kultur auf $4,9 \cdot 10^{-1} \mu\text{Mol/g Tr.gew.}$, in der N-freien Kontrolle dagegen nur auf $0,3 \cdot 10^{-1} \mu\text{Mol/g Tr.gew.}$ Abgesehen davon, daß ein Defizit von einer ganzen 10-er Potenz vorliegt, muß schon aus der gegenläufigen Tendenz gefolgert werden, daß die direkte Umwandlung von Abbauprodukten des Chlorophylls in SC wenig Wahrscheinlichkeit besitzt. Fände nämlich eine solche Umwandlung statt, so wäre zu erwarten, daß einer starken Chlorophyllabnahme auch eine starke Astacinbildung entspricht. Wie aber zu ersehen ist, sind die Verhältnisse gerade umgekehrt.

Ebensowenig ergeben sich aber auch Anhaltspunkte für eine pauschale Umwandlung der gesamten Primärxanthophylle. Auch hier weist die Pigmentänderung dieselbe Charakteristik auf. Über die Möglichkeit der Umwandlung eines speziellen Carotinoids wird in Kapitel E, Absatz 2 berichtet werden.

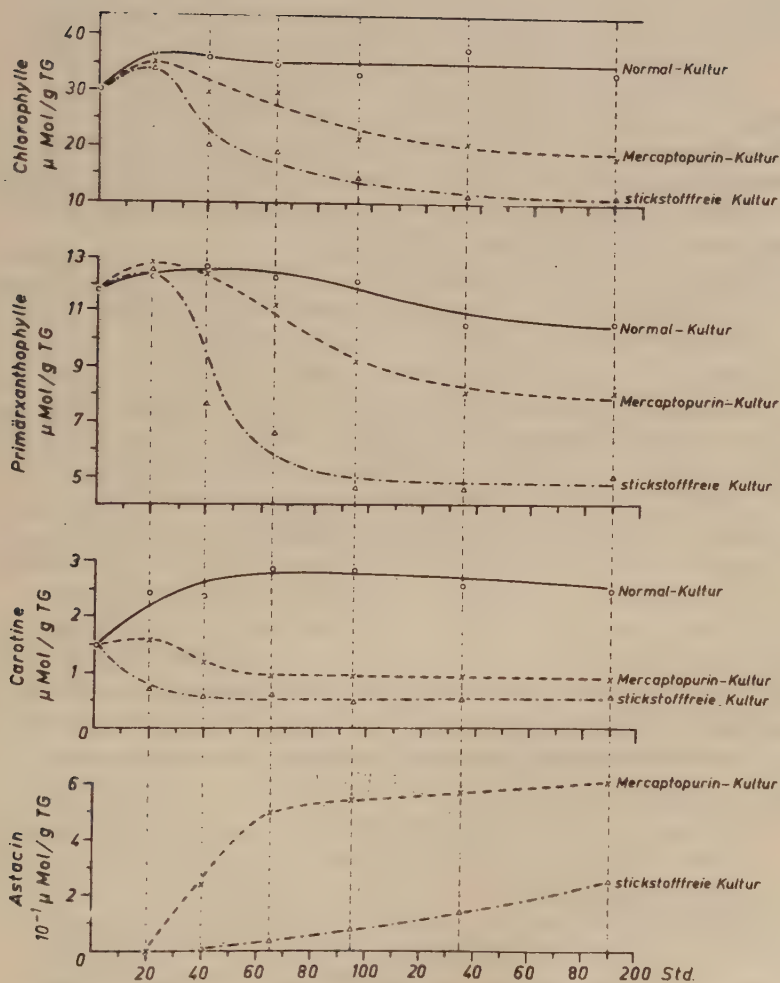


Abb. 14: Zeitlicher Verlauf der Pigmentmengenänderungen in *Ankistrodesmus* bei Anwesenheit von Mercaptopurin in der Normalkultur im Vergleich zur N-freien Kultur und Normalkultur

5. Einfluß von Chloramphenicol (CAP) auf die Astacinsynthese

Im Rahmen der Versuche mit Hemmstoffen der Proteinsynthese testeten wir auch das Chloramphenicol (CAP) auf eine astacininduzierende Wirkung. CAP gilt als ein gut erprobter und wirksamer Proteinsynthesehemmstoff bei Bakterien. Auch bei Euglena und in höheren Pflanzen soll CAP eine Hemmwirkung ausüben. (POGO et al. 1965; AARONSON et al. 1968; MALOTKOVSKY et al. 1964; ELLIS 1969). Eine Hemmung des Wachstums bei einzelligen Grünalgen wurde von TAYLOR (1965) und CZYGAN (1964a) beobachtet. Nach MORRIS (1966b) soll aber CAP in Chlorella keine spezifische Hemmung der Proteinsynthese zeigen. Wir applizierten CAP in gestaffelten Konzentrationen von 10^{-5} bis 10^{-2} M an N-haltigen Kulturen, konnten aber im Gegensatz zu den Experimenten mit Actidion und den Basenanaloge in keinem Fall eine Astacinbildung induzieren. CZYGAN (1964b) berichtet von einer sonderbaren Wirkung des CAP in N-Mangelkulturen von Ankistrodesmus. Seinen Befunden zufolge verhindert das CAP in N-freien Kulturen den Abbau der Primärpigmente und die Bildung von Astacin. Dagegen wird die Pigmentrestitution in Mangelkulturen nach N-Zugabe durch CAP nicht beeinflusst. Wir konnten diese Befunde bestätigen (siehe auch Abb. 19, S. 56). Aus der Tatsache, daß CAP die Restitution der Primärpigmente nicht hemmt, kann abgeleitet werden, daß CAP die Pigmentsynthese unbeeinflusst läßt. Die Verhinderung des Primärpigmentabbaus und der Astacinneubildung durch CAP ist aber nicht auf eine Aktivitätsminderung pigmentabbauender Enzyme zurückzuführen, wie CZYGAN (1968b) vermutet, sondern auf Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels (siehe Kapitel D, Abschnitt 2, Abs. 3).

6. Kurze Diskussion

Die Versuchsergebnisse mit Hemmstoffen der Proteinbiosynthese machen es wahrscheinlich, daß die Wirkung des N-Mangels auf die SC-Bildung letztlich auf einer Einstellung der Proteinsynthese beruht. Mit Hilfe der Hemmstoffe wird also eine Art

Künstlicher N-Mangel erzeugt, der sich über die Einschränkung der Proteinsynthese letztlich in der Bildung von Astacin als solcher zu erkennen gibt. Wegen des schnellen Erscheinens von Astacin in den Hemmstoffkulturen muß man annehmen, daß dieser künstliche N-Mangelzustand rascher wirksamer ist, als der natürliche, da bei letzterem wohl eine gewisse Zeit vergeht, bis sich völlige Erschöpfung N-haltiger Vorstufen in einer ebenso starken Herabsetzung der Proteinsynthese niederschlägt. Vermutlich findet daher auch früher eine gewisse Disintegration der Thylakoide statt, was zur Bildung von Astacin und einer Abnahme der Primärpigmente führt (siehe später). Als äußeres Kennzeichen für die raschere Einschränkung der Proteinsynthese in Hemmstoffkulturen ist auch die sofortige Einstellung der Vermehrung zu werten, wogegen diese in N-Mangelkulturen noch für eine bestimmte Zeit vorhält.

Wie den Kurven in Abb. 13 und Abb. 14 zu entnehmen ist, kann aber der N-Mangelzustand nur in begrenztem Umfang durch Hemmstoffe nachgeahmt werden. Offensichtlich beeinträchtigen diese nach längerer Einwirkung auch die Photosynthese, was nach unseren Befunden zwangsläufig zu einer Verzögerung des Primärpigmentabbaus und der Astacinneubildung führen muß (siehe später).

7. Zusammenfassung

1. Durch die Hemmstoffe der Proteinsynthese Actidion und die Basenanaloga 5-Fluoruracil, 8-Azaguanin und 6-Mercaptopurin kann in N-haltigen Kulturen die Astacinbildung induziert werden.
2. Die Einwirkung der genannten Hemmstoffe führt schneller zum Auftreten meßbarer Mengen an Astacin als in N-freien Kulturen. Die gebildeten Astacinmengen sind in den ersten 10 Tagen vergleichsweise größer als in der N-freien Kontrolle.

3. Nach etwa 10 Tagen Kulturdauer erfährt die Astacinbildung keine besondere Steigerung mehr, was mit einer Beeinträchtigung der für die SC-Bildung notwendigen Photosynthese durch Hemmstoffe erklärt werden kann (Versuche dazu in Kapitel D, Abschnitt 2).
4. Primärpigmentabnahme und Astacinneubildung lassen keinerlei stöchiometrischen Zusammenhang erkennen.
5. Der Proteinsynthesehemmstoff Chloramphenicol bewirkt keine Astacinbildung in N-haltigen Kulturen, verhindert aber in N-Mangelkulturen den Abbau der Primärpigmente und die Bildung von Astacin.
6. Das Auftreten von SC kann durch Hemmung der Proteinbiosynthese trotz Anwesenheit von Stickstoff in der Nährlösung hervorgerufen werden.

D. DIE ABHÄNGIGKEIT DER SEKUNDÄRCAROTINOIDSYNTHESE VOM KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL

E i n l e i t u n g

Verschiedentlich ist in der Literatur berichtet worden, daß die Verabreichung hoher Gaben Zucker an Grünalgenkulturen eine Bleichwirkung zur Folge hat. Nach den Beobachtungen von ISHIKAWA et al. (1964) sollen dabei gleichzeitig die Lamellarstrukturen in den Chloroplasten z.T. aufgelöst werden und eine diffuse Lage einnehmen. ISHIKAWA und andere Autoren sehen die Ursache für diesen Bleicheffekt in einer Verschiebung des Verhältnisses von Stickstoff zu Kohlenhydraten in der Zelle.

Dieser durch hohe Zuckergaben induzierte Bleicheffekt ähnelt dem Vergilben einer Ankistrodesmus-Kultur unter N-Mangel.

Die Untersuchungen ergaben, daß N-freie Dunkelkulturen ohne Glukose nicht in der Lage sind, Astacin zu bilden. Daraus mußte zwangsläufig gefolgert werden, daß N-Mangel allein nicht ausreicht damit Sekundärcarotinoide entstehen, sondern daß die unter N-Mangel auftretenden Veränderungen in der Pigmentgarnitur gleichermaßen vom Ablauf des KH-Stoffwechsels abhängig sind. So gesehen sind also die unter N-Mangel auftretenden Pigmentveränderungen nicht bloß als eine passive, substrat- oder energieunabhängige Umlagerungserscheinung zu betrachten - wie man es für einen Alterungsvorgang vielleicht annehmen möchte - sondern als ein aktiver Prozeß, der ganz an die Tätigkeit des KH-Stoffwechsels gebunden ist. Ausgehend von dieser Erkenntnis interessierte zunächst die Frage, in welchem Maße chlorophyllarme autotrophe N-Mangelkulturen überhaupt noch in der Lage sind, Photosynthese zu betreiben. Ferner mußte überprüft werden, inwieweit bestimmte Substanzen, welche die Astacinsynthese blockieren, auch die Photosynthese bzw. Atmung hemmend beeinträchtigen und somit die Astacinbildung unterdrücken. Unter diesem Gesichtspunkt untersuchten wir auch nochmals die Hemmeigenschaften des Chloramphenicols (s. Abschnitt 2, Absatz 3).

Abschnitt 1: Einige physiologische Merkmale N-freier Kulturen
in Beziehung zum Kohlenhydratstoffwechsel

1. Einstellung der Vermehrung

Als äußeres Kennzeichen für das Einsetzen akuten N-Mangels in autotrophen Lichtkulturen ist die allmähliche Herabsetzung der Zellteilung anzusehen. Entgegen unseren Erwartungen erfolgt diese nicht sofort nach Überführung in N-freies Medium, sondern nach und nach, vorausgesetzt, daß Energie für den Teilungsprozeß zur Verfügung steht. Um einigermaßen optimale Ernährungsbedingungen zu gewährleisten, wurden die Algen zu-
meist bei relativ geringer Suspensionsdichte geerntet und für Versuchsansätze mit frischer Nährlösung versehen. Zur Zellzahlbestimmung wurde 1 ml Suspension mit 9 ml Nährlösung verdünnt und in 4 x 16 Zählquadraten einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die in Abb. 15 angegebenen Zellzahlen beziehen sich auf ein Zählvolumen von 16 Zählquadraten = 10^{-1} mm^3 . In Abb. 15 ist der zeitliche Verlauf der Zellzahlenentwicklung in verschiedenen Nährmedien dargestellt. Die Zellzahldichte betrug zu Beginn in jeder Kultur $125/10^{-1} \text{ mm}^3$. Es war überraschend, daß N-freie Lichtkulturen noch über einen langen Zeitraum ihre Teilungsfähigkeit beibehalten.

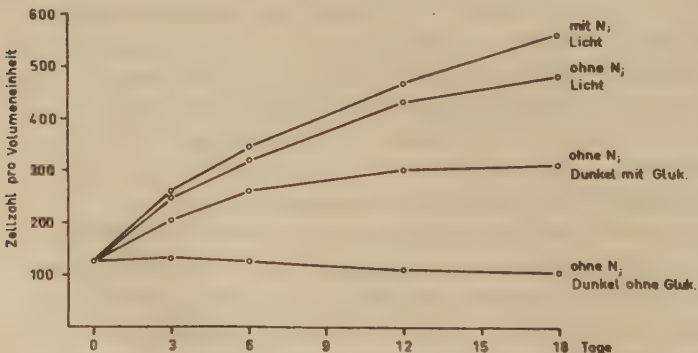


Abb. 15: Kinetik der Zellvermehrung unter verschiedenen Kulturbedingungen

Dagegen tritt sofort völliger Teilungsstillstand ein, wenn N-freie Kulturen im Dunkeln ohne Glukosezusatz belassen werden. Dies zeigt, daß der Teilungsvorgang viel stärker durch Energie- als durch N-Mangel beeinträchtigt wird. Offenbar verfügen frisch in N-freies Medium überführte Zellkulturen noch über einen gewissen "Vorrat" an zellgebundenen Stickstoff, der zusammen mit Einschmelzprodukten aus Strukturproteinen noch für eine gewisse Zeit eine Zellteilung ermöglicht.

Während die Zellvermehrung in N-freien Lichtkulturen nach 12 Tagen Kulturdauer nur geringfügig gegenüber der N-haltigen Kontrolle zurückbleibt, findet in gleich alten N-freien Dunkelkulturen mit 0,3% Glukosezusatz nahezu keine Teilung mehr statt. Man muß daher annehmen, daß es in Gegenwart von Glukose infolge eines intensiveren Betriebsstoffwechsels und einer bedeutenden Zunahme des Zellvolumens schneller zu einer Verarmung zellgebundenen Stickstoffs kommt.

2. Verstärkte Lipidsynthese

Bei anhaltender Kultur unter N-Mangel kommt es in zunehmendem Maße zu einer Anhäufung von Lipiden. Zugabe von Glukose zu N-freien Lichtkulturen (mixotrophe Ernährung) führt unter beschleunigter Chlorophyllabnahme zu verstärkter Lipidbildung. Etwa ab 10. bis 12. Kulturtag macht sich die Zunahme der Lipidmenge im Pigmentextrakt störend in der Dünnschichtchromatographie bemerkbar. Zusammen mit den Carotinen und dem Astacinester P_3 läuft der Hauptanteil der farblosen Lipide unter Schlierenbildung an der Lösungsmittelfront auf Dünnschicht A. Bei Rechromatographie auf Kieselgel- G-Schichten (Laufmittel Hexan: Diäthyläther : Eisessig = 80:20:1) kann die Zunahme der farblosen Lipide mittels UV-Fluoreszenz oder Jodierung qualitativ verfolgt werden. Nach den Untersuchungen von MAYER und CZYGAN (1959) beträgt die Menge der Gesamtlipide in N-Mangelkulturen von Ankistrodesmus nach 6 Tagen Kulturdauer 4,88 mg/100 ml Suspension, nach 35 Tagen aber mehr als das Zehnfache, nämlich 56,4 mg/100 ml Suspension. Diese enorme Steigerung der

Lipidsynthese unter N-Mangel ist eine allgemein verbreitete Erscheinung, wie sie von vielen anderen Autoren auch bei höheren Pflanzen beobachtet wurde. Als Ursache muß eine Störung der Korrelation von KH- und Proteinsynthese angesehen werden. Mangels reduzierten Stickstoffs können keine Aminosäuren mehr gebildet werden, was zu einer Anhäufung von Carbonsäuren führt. Die Zelle versucht nun dem Überangebot an C-Körpern auszuweichen, indem sie diese in hochkondensierten Verbindungen, wie z.B. Fettsäuren, festlegt und in besonderen Lipidvakuolen bzw. Plastoglobuli akkumuliert.

3. Beziehungen zwischen photosynthetischer O₂-Entwicklung und Chlorophyllabnahme

WILLSTÄTTER und STOLL (1918) untersuchten bereits eingehend die Abhängigkeit der CO₂-Assimilation vom Chlorophyllgehalt der Zelle. Als Maß für die Assimilationsleistung des Chlorophylls definieren sie eine sog. Assimilationszahl, die sich aus dem Quotienten der stündlich assimilierten CO₂-Menge in g zu Chlorophyllmenge in g ergibt. Zu ihrer Überraschung stellten sie fest, daß die Assimilationszahl chlorophyllarmer Blätter gelber Varietäten um das 10- bis 15-fache höher liegt, als die Assimilationszahl chlorophyllreicher Blätter. Daraus muß gefolgert werden, daß die CO₂-Assimilation in chlorophyllarmen Pflanzen nicht in dem selben Maße abnimmt wie das Chlorophyll. Ferner muß man annehmen, daß von den verbleibenden restlichen Chlorophyllmolekülen relativ mehr - d.h., bezogen auf die Gesamtzahl der Chlorophyllmoleküle - photosynthetisch wirksam sind, als in chlorophyllreichen Objekten. WILD und EGLE (1968 und 1969) diskutieren in diesem Zusammenhang die Variabilität der photosynthetischen Einheit, wobei man bedenken sollte, daß dem Begriff der "photosynthetischen Einheit" keine klare Definition zugrunde liegt (THOMAS 1968). Nach Auffassung von WILD und EGLE besteht eine photosynthetische Einheit in der grünen Chlorella aus etwa 250 - 300 Chlorophyllmolekülen, in der chlorophyllarmen, gelben Mutante dagegen schon aus 100 Mo-

lekülen. D.h., 100 Moleküle der gelben Varietät vollbringen dieselbe photosynthetische Leistung wie 300 Moleküle der grünen Form. Obgleich in der gelben Mutante auch die absolute Zahl der photosynthetischen Einheiten geringer ist als in der grünen Chlorella, was sich auch in der meßbaren photosynthetischen Leistung widerspiegelt, so beträgt das Verhältnis der photosynthetischen Einheiten zwischen der grünen Normalform und der gelben Mutante doch nur 1,7:1, wogegen das Verhältnis der Chlorophyllmengen 5,1:1 ausmacht. Die Anzahl der photosynthetischen Einheiten und damit die Zahl der Redoxsysteme des Elektronentransports ist daher in der chlorophyllarmen Chlorella bei weitem nicht in dem Ausmaß reduziert, wie es der Chlorophyllmangel erscheinen läßt.

Da wir festgestellt haben, daß die Astacinbildung in N-freien Lichtkulturen ganz an die Tätigkeit der Photosynthese gebunden ist, interessierte uns auch die Frage, in welchem Maße chlorophyllarme N-Mangelkulturen überhaupt noch zur Photosynthese befähigt sind. Darüber hinaus sollte noch untersucht werden, ob auch N-Mangelkulturen eine Zunahme der Assimilationszahl aufweisen, d.h. ob das Verhältnis von assimilierter CO_2 -Menge - oder was dasselbe ist, von entwickelter O_2 -Menge - zu Chlorophyllmenge größer ist als in chlorophyllreichen Normalkulturen. Das Ergebnis ist als Säulendiagramm in Abb. 16 wiedergegeben. Aus der Darstellung ist zu entnehmen, daß mit der starken Abnahme des Chlorophylls nach 10 Tagen Kulturdauer in N-freiem Medium keine gleichwertige Abnahme der O_2 -Produktion (bezogen auf das Tr.gew.) verbunden ist. Beträgt das Verhältnis der Chlorophyllmengen zwischen N-haltiger und N-freier Kultur 5,8:1, so herrscht zwischen den produzierten O_2 -Mengen (ebenfalls bezogen auf das Tr.gew.) nur mehr ein Verhältnis von 3,5:1. Bildet man den Quotient von produzierter O_2 -Menge zu Chlorophyllmenge, d.h. die Assimilationszahl, so ist zu ersehen, daß diese in der chlorophyllarmen Mangelkultur um das 1,8-fache größer ist, als in der N-haltigen Kontrolle. N-Mangelkulturen von Ankistrodesmus zeigen also in der Beziehung von Photosyntheseleistung und Chlorophyllgehalt dieselbe

Charakteristik, wie die von WILLSTÄTTER und STOLL bzw. WILD und EGLE untersuchten gelben Mutanten. Ferner ist aus dieser Untersuchung abzuleiten, daß unter N-Mangel trotz der beobachteten Chloroplastendisintegration keine totale Schädigung des Photosyntheseapparates erfolgt. Man muß also eine Verkleinerung der "photosynthetischen Einheit" annehmen, welche noch eine ausreichende Photosynthese und damit KH-Bildung hervorruft, um die SC-Bildung zu ermöglichen.

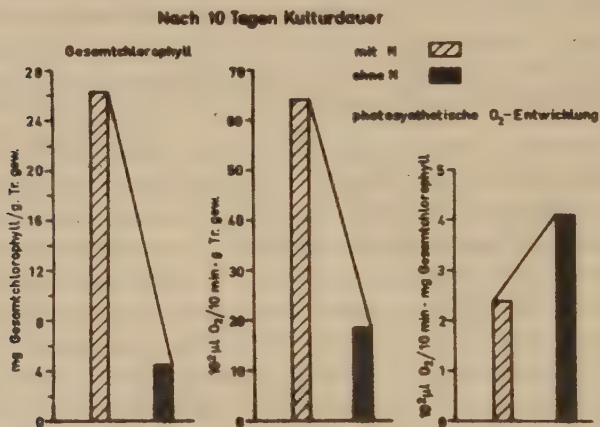


Abb. 16: Vergleichende Gegenüberstellung von Chlorophyllgehalt und photosynthetischer O₂-Entwicklung in einer Normal- und einer N-Mangelkultur

Abschnitt 2: Die Sekundärcarotinoidbildung bei autotropher Ernährungsweise

1. Unterdrückung der Astacinbildung durch DCMU

Die Anzucht N-freier Kulturen im Dunkeln hatte gezeigt, daß ohne Glukosezusatz kein Astacin gebildet werden kann. Es war also offensichtlich, daß für die Bildung von SC außer N-Mangel unbedingt auch die Tätigkeit des KH-Stoffwechsels erforderlich ist. Es war daher zu fragen, ob die Astacinsynthese in N-freien Lichtkulturen über die Photosynthese ebenfalls an das Vorhandensein von KH gebunden ist.

DCMU, 3- (3,4-dichlorphenyl) - 1,1-dimethylharnstoff hemmt spezifisch die Lichtreaktion II der Photosynthese. Nach einmaliger Verabreichung von $2 \cdot 10^{-5}M$ DCMU stellte sich heraus, daß nach 7 Tagen Kulturdauer die DCMU-Kultur nahezu dieselbe Astacinmenge enthielt wie die DCMU-freie Kontrolle. Photosynthesemessungen bestätigen, daß DCMU zwar sofort die photosynthetische O_2 -Entwicklung hemmt, aber nach längerer Zeit (etwa 24 Std.) in seiner Hemmwirkung stark nachläßt. Durch fortlaufende Verabreichung von $2 \cdot 10^{-5}M$ bzw. $1 \cdot 10^{-5}M$ DCMU im Abstand von 24 Std. konnte schließlich auch eine Unterdrückung der Astacinbildung erzielt werden. Das Ergebnis ist in Abb. 17 dargestellt.

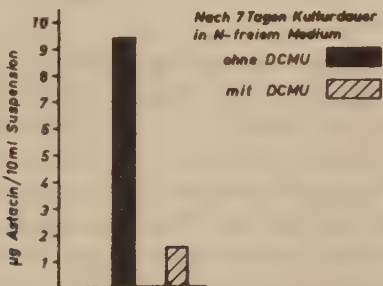


Abb. 17: Unterdrückung der Astacinbildung durch fortlaufende Verabreichung von $2 \cdot 10^{-5}M$ bzw. $1 \cdot 10^{-5}M$ DCMU im Abstand von 24 Std.

Die geringe Menge Astacin in der DCMU-Kultur ist sicher auf die eben erwähnte nachlassende Hemmwirkung dieser Substanz zurückzuführen. Damit kann als gesichert angesehen werden, daß die Tätigkeit der Photosynthese eine unabdingbare Voraussetzung für die Bildung von SC darstellt.

2. Unterdrückung der Astacinbildung durch o-Phenanthrolin, Salicylalldoxim, Dinitrophenol, Isonicotinsäurehydrazid und ihr Einfluß auf die Photosynthese

Im Laufe dieser Arbeit wurde eine Reihe von Substanzen getestet, von denen bekannt ist, daß sie ganz bestimmte Reaktionen in der Zelle blockieren. Obgleich ihre Verwendung unter recht unterschiedlichen Versuchsabsichten erfolgte, zeigte sich, daß einige von ihnen sehr wirksam die Astacinbildung in N-freien Lichtkulturen blockieren.

o-Phenanthrolin (o-Phen) ist ein Chelatbildner, der die O_2 -entwickelnde Lichtreaktion II bei der Photosynthese hemmt (LOSADA und ARNON 1963), der aber auch die cyclische Photophosphorylierung erniedrigt (WHATLEY et al., 1959). $1 \cdot 10^{-4}M$ o-Phenanthrolin hemmte für eine Versuchsdauer von 10 Tagen die Astacinbildung zu 100 %. Seine Hemmwirkung auf die photosynthetische O_2 -Produktion (Abb. 18) ist nach 14-stündiger Einwirkungsdauer noch unverändert groß.

Salicylalldoxim (Sal) hemmt die photosynthetische O_2 -Entwicklung in isolierten Chloroplasten (TREBST 1963). TANNER et al. (1969) berichten, daß Sal spezifisch die cyclische Photophosphorylierung hemmt (nachgewiesen durch die gehemmte Photoreduktion bei der Hydrogenase-haltigen Grünalge *Ankistrodesmus*), wobei die O_2 -Entwicklung und CO_2 -Fixierung kaum berührt werden. Da Sal unter Entkopplerwirkung die endogene Atmung stimuliert, ist die bisher beobachtete Hemmung der photosynthetischen O_2 -Entwicklung und $^{14}CO_2$ -Fixierung nur eine scheinbare. Durch die unter dem Einfluß von Sal gesteigerte Produktion von nicht-radioaktivem Atmungs- CO_2 wird das applizierte mar-

kierte Carbonat ausgedünnt, so daß weniger markiertes CO_2 fixiert wird. Ebenso verhält es sich mit der Messung der O_2 -Entwicklung: durch den verstärkten O_2 -Verbrauch unter Sal-Einwirkung wird ein Teil des entwickelten Sauerstoffs aufgebraucht, so daß insgesamt eine verminderte O_2 -Produktion gemessen wird. In der Tat übt von den hier aufgeführten Hemmstoffen das Sal ($2 \cdot 10^{-3}\text{M}$) nach 14-stündiger Einwirkungsdauer auch die schwächste "Hemmwirkung" der O_2 -Entwicklung aus (Abb. 18).

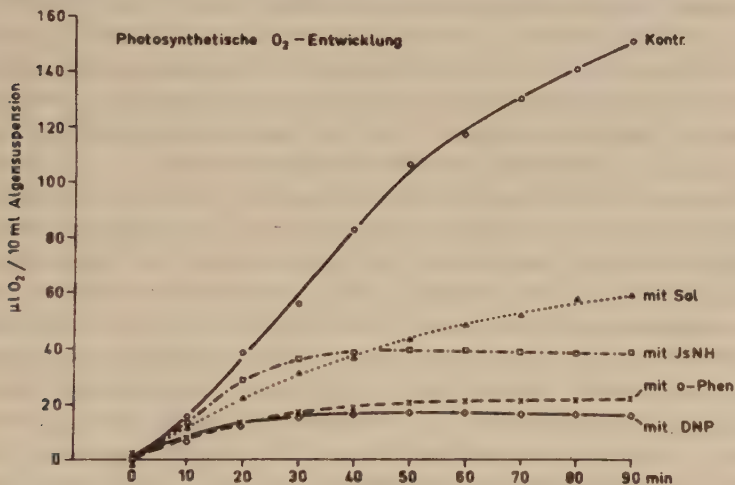


Abb. 18: Einfluß von o-Phenanthrolin ($1 \cdot 10^{-4}\text{M}$), Salicylaldoxim ($2 \cdot 10^{-3}\text{M}$), Dinitrophenol ($1 \cdot 10^{-3}\text{M}$) und Isonicotinsäurehydrazid ($1 \cdot 10^{-2}\text{M}$) auf die photosynthetische O_2 -Entwicklung in N-freien Kulturen nach 14 Std. Vorinkubation

Nach 10 Tagen Einwirkung von Sal ($2 \cdot 10^{-3}\text{M}$) war dann aber eine Herabsetzung der Astacinbildung auf 33 % der Kontrolle zu beobachten. Diese Wirkung kann auf eine teilweise Blockierung der Photosynthese zurückgeführt werden, welche offensichtlich bei längerer Einwirkung von Sal einsetzt. Dies erklärt die Diskre-

panz zu den nur 2 1/2 Stunden dauernden Fixierungsversuchen von TANNER et al. (1969). Die anfängliche im vollen Umfang noch stattfindende CO₂-Fixierung führt zu der beobachteten Astacinbildung von 33 % der Kontrolle.

2,4-Dinitrophenol (DNP) entkoppelt spezifisch die oxydative Phosphorylierung. Seit den grundlegenden Untersuchungen von MITCHELL (1961) wird Entkopplersubstanzen allgemein ein fördernder Einfluß auf die H⁺-Ionenpermeabilität durch Lipoprotein-Membranen zugeschrieben (BIELAWSKI et al. 1966; HOPFER et al. 1968). Diese Eigenschaft schien uns sehr willkommen, um die Ursache der Aciditätswirkung auf die Astacin-Induktion in N-haltigen Kulturen näher zu untersuchen (Kapitel B). Da wir nämlich zunächst vermuteten, daß die Astacinbildung möglicherweise an eine Erhöhung der H⁺-Ionenkonzentration in der Zelle gebunden ist (Aktivierung einer Oxygenase mit scharfem pH-Optimum im sauren Bereich), so erwarteten wir unter dem Einfluß von DNP in sauren N-freien Kulturen (pH 5,0) eine merkliche Steigerung der Astacinbildung gegenüber der Kontrolle. Diese Erwartung erfüllte sich jedoch nicht; die Astacinbildung wurde im Gegenteil bei Anwesenheit von $1 \cdot 10^{-3}M$ DNP vollständig unterdrückt. Es war daher naheliegend, daß DNP nach längerer Einwirkungsdauer - der Versuch erstreckte sich über 6 Tage - auch die Photosynthese blockiert. In der Literatur fanden sich dazu Hinweise. KROGMANN et al. (1959) stellten fest, daß DNP in Spinatchloroplasten nicht nur die ATP-Bildung der Hill-Reaktion hemmt, sondern auch den Elektronentransport, da Ferricyanid nicht reduziert wird. NEUMANN und JAGENDORF (1964) konnten diesen Befund bestätigen, jedoch mit der Einschränkung, daß nach ihren Untersuchungen die Hemmwirkung von DNP pH-abhängig ist. Nach ihren Beobachtungen hemmt DNP den Elektronentransport der Lichtreaktion 2 und die nichtcyclische Photophosphorylierung nur, wenn der pH-Wert im Reaktionssystem größer als 7,0 ist; bei einem pH-Wert unter 7,0 ist die Hemmung aufgehoben.

Aus Abb. 18 ist eine Hemmwirkung des DNP (nach 14 Std. Einwirkungsdauer) auf die Photosynthese zu ersehen, woraus sich wiederum die Unterdrückung der Astacinbildung erklärt. Daß es

sich bei der starken Depression der O_2 -Produktion nicht um einen scheinbaren Effekt durch eine gleichzeitig gesteigerte Atmung auf Grund einer Entkoppler-Wirkung des DNP handelt, beweist Abb. 25. Nach 14 Std. Vorinkubation ist auch die Atmung vollständig gehemmt.

Isonicotinylhydrazid hemmt nach den Untersuchungen von SHAH et al. (1968) in etioliierten Maissämlingen die β -Carotinsynthese bis zu 55 %. Die Hemmwirkung dieser Substanz auf die Carotinsynthese wird erklärt durch eine Blockierung der Bildung von Acetyl-CoA auf dem Wege Glycollat $\longrightarrow$ Glyoxylat $\longrightarrow$ Glycin $\longrightarrow$ Serin $\longrightarrow$ Pyruvat $\longrightarrow$ Acetyl-CoA.

Im Rahmen unserer Versuche zur Biogenese des Astacins testeten wir das leichter beschaffbare Derivat Isonicotinsäurehydrazid ($1 \cdot 10^{-2}M$) (IsNH) auf seine Hemmwirkung gegenüber der Astacinbildung. In der Tat blockiert IsNH über einen Zeitraum von 12 Tagen die Astacinbildung nahezu vollständig. Die Primärpigmente bleiben dabei gänzlich unverändert. Eine Schädigung der Zellen war nicht festzustellen. Die Überprüfung der photosynthetischen O_2 -Entwicklung ergab ebenfalls eine sehr bezeichnende Hemmwirkung dieser Substanz auf die Photosynthese (Abb. 18). Auch hier kann also die Hemmung der Photosynthese als Ursache der fehlenden Astacinbildung angesehen werden.

3. Einfluß von Chloramphenicol (CAP)

3.1. Unterdrückung der Astacinbildung und Aufhebung der CAP-Wirkung durch Glukosezusatz

In Kapitel C, Abs. 4, wurde bereits berichtet, daß das Antibiotikum CAP im Gegensatz zu den anderen Proteinsynthesemmstoffen in autotrophen N-haltigen Lichtkulturen keine astacininduzierende Wirkung besitzt. Dagegen verhindert es ($2 \cdot 10^{-4}M$) in N-freien Lichtkulturen die Astacinbildung über einen Zeitraum von 12 Tagen praktisch vollständig. Fügt man jedoch CAP-haltigen N-freien Lichtkulturen 0,2 % Glukose hin-

zu, erscheint Astacin. Allerdings beträgt die gebildete Astacinmenge in Gegenwart von 0,2 % Glukose, also bei mixotropher Ernährungsweise, nur etwa 50 % der Kontrolle, wie aus Abb. 19 zu ersehen ist.

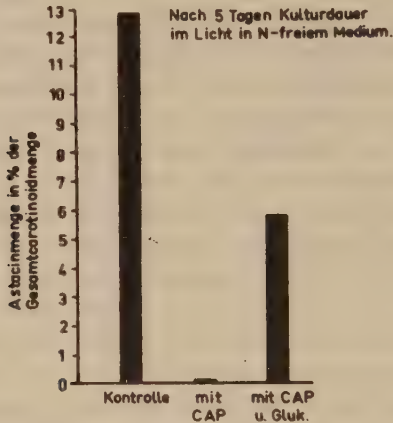


Abb. 19: Aufhebung der Hemmwirkung des CAP auf die Astacinbildung in N-freien Lichtkulturen durch Zugabe von 0,2 % Glukose

Aus diesem Befund ist nun leicht zu folgern, daß die Wirkung des CAP nicht auf einer Hemmung der Astacinsynthese selbst beruhen kann, sondern auch hier in der Blockierung der Photosynthese zu suchen ist.

3.2. Einfluß von CAP auf die $^{14}\text{CO}_2$ -Fixierung

Da die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß der Nachschub von Kohlenhydraten sowohl für die Bereitstellung von Astacinvorstufen wie für den Einschmelzungsprozeß der Thylakoide erforderlich ist, untersuchten wir, welchen Einfluß CAP auf die CO_2 -Fixierung ausübt. Nach 14 bzw. 140 Std. Vorinkuba-

tion N-freier Kulturen mit $2 \cdot 10^{-4}M$ CAP wurden 40 ml Algen-suspension entnommen, schonend abzentrifugiert, mit Phosphat-puffer gewaschen und mit 3 ml Phosphatpuffer (1/15 M) erneut aufgenommen. Die konzentrierte Algensuspension wurde mit 0,5 ml $KHCO_3$ -Lösung (20 mg/ml) und 0,5 ml $KH^{14}CO_3$ -Lösung ($12 \mu Ci/ml$) versetzt. Nach 5 min Belichtung (Warburg mit Rotfilter) wurden 0,1 ml Suspension in vorbereitete Reagenzgläser pipettiert, welche 1 ml eines Gemisches von Äthanol und 5 % Eisessig enthielten. Davon wurden 0,15 ml auf Alu-Plättchen gebracht, eingetrocknet und im Methan-Durchflußzähler ausgezählt. Wir konnten feststellen, daß CAP nach längerer Einwirkungsdauer eine recht beachtliche Hemmwirkung auf die $^{14}CO_2$ -Fixierung ausübt (Abb. 20). So beträgt der Anteil des fixierten $^{14}CO_2$ nach 14 Std. CAP-Einwirkung 60 % der Kontrolle, nach 140 Std. CAP-Einwirkung nur noch 14 %. Dies beweist, daß die Unterdrückung der Astacinbildung durch CAP ebenfalls auf der Hemmung der CO_2 -Fixierung beruht.

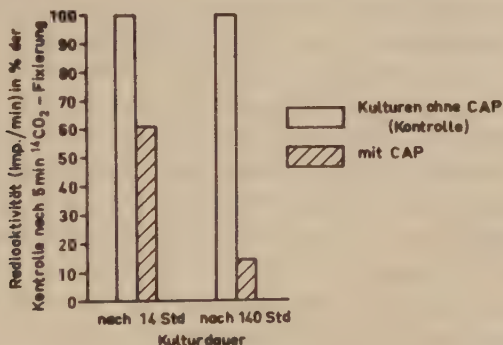


Abb. 20: Hemmung der $^{14}CO_2$ -Fixierung durch CAP in N-freien Kulturen

Eine solche Hemmung des ^{14}C -Einbaus durch CAP wurde auch von anderen Autoren beobachtet. So berichtet HÖFNER (1963) von einer Hemmung der ^{14}C -Aufnahme in Gerstenwurzeln und MARGU-

LIES (1964) von einer Blockierung der Photosynthese aber nicht der Chlorophyllsynthese in Phaseolus. MORRIS (1966b) konnte bei Chlorella unter dem Einfluß von CAP keine spezifische Hemmung der Proteinsynthese messen, wohl aber eine Hemmung der $^{14}\text{CO}_2$ - und Glukoseassimilation. Aus unseren Dunkelversuchen mit CAP und der aufgehobenen Hemmwirkung auf die Astacinbildung durch Glukose (Abb. 27) müssen wir dagegen eine Blockierung der Glukoseassimilation durch CAP bei Ankistrodesmus ausschließen. Die unterschiedliche Wirkungsweise des CAP im Vergleich zu den anderen Proteinsynthesehemmstoffen muß mit seinem selektiven Hemmechanismus erklärt werden. Während die Basenanaloga die Proteinsynthese z.T. schon auf dem Niveau der NS-Synthese blockieren und Cycloheximid die Proteinsynthese spezifisch nur an den cytoplasmatischen Ribosomen hemmen soll (ELLIS 1967), läßt CAP diesen Teil der Proteinsynthese unbeeinflusst. Nach den Untersuchungen von AARRONSON et al. (1967) und ELLIS (1969) soll die Hemmwirkung des CAP nur auf die Chloroplasten-Ribosomen beschränkt sein. Da der Hauptanteil des Proteins aber an den cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert wird, muß sich eine Hemmung dieses Teiles der Proteinsynthese eher als eine Art "künstlicher N-Mangel" auswirken als die blockierte Proteinsynthese in den Chloroplasten. Es ist zwar kaum etwas über die Art des in den Chloroplasten synthetisierten Proteins bekannt, doch wäre es denkbar, daß es sich dabei vornehmlich um funktionell wichtige Proteine, also um Enzymproteine handelt, von denen ein Teil in bestimmten Abschnitten die Photosynthese katalysiert. Der hemmende Einfluß des CAP auf die Photosynthese wäre dann in dieser Weise zu verstehen.

4. Unterdrückung der Astacinbildung durch N_2 -Begasung im Licht

Aus den eben geschilderten Versuchen geht hervor, daß die Astacinbildung in Lichtkulturen neben N-Mangel gleichermaßen die Tätigkeit der Photosynthese zur Voraussetzung hat. Es sollte nun herausgefunden werden, worin die Bedeutung der Photo-

synthese für die Astacinbildung zu suchen ist. Dabei war an zwei Dinge zu denken: Die Astacinbildung bedarf entweder nur der Bereitstellung von Energie oder sie bedarf der Nachlieferung von C-Körpern (und Energie), sei es für die Neusynthese von Astacinvorstufen oder für einen regulativen Prozeß. Unter Bedingungen, unter welchen nur einer der beiden Vorgänge stattfindet, sollte es möglich sein, diese Frage zu entscheiden. Dies ist z.B. bei N_2 -Begasung von Lichtkulturen der Fall. KANDLER und TANNER (1966) konnten nämlich durch die Photoassimilation von Glukose nachweisen, daß unter N_2 -Begasung im Licht die cyclische Photophosphorylierung abläuft. Da aber kein CO_2 zur Verfügung steht, können keine C-Körper nachgeliefert werden, d.h. die Photosynthese liefert unter N_2 -Begasung nur Energie in Form von ATP. N-freie Lichtkulturen, welche 9 Tage lang mit N_2 begast wurden, blieben normal grün, ohne auch nur eine Spur von Astacin zu bilden. Dabei ist bemerkenswert, daß bei Ausschaltung der CO_2 -Assimilation auch kein Abbau der Primärpigmente erfolgt und offensichtlich auch keine Auflösung der Thylakoide. Man muß daher annehmen, daß nicht nur die Astacinbildung sondern auch die Chloroplastendisintegration und damit der Primärpigmentabbau streng an die Nachlieferung und Metabolisierung von KH gebunden ist. Denn wie der Versuch gezeigt hat, reichen N-Mangel und Energieversorgung allein noch nicht aus, damit Primärpigmente abgebaut werden und Astacin erscheint.

Abschnitt 3: Die Sekundär-carotinoidsynthese bei hetero- und mixotropher Ernährungsweise

1. Die Bleichwirkung der Saccharose in N-haltigen Normalkulturen

Verschiedene Autoren berichten, daß ein steigender Gehalt an Zucker im Nährmedium ein Ausbleichen von Algenkulturen zur Folge hat, d.h. unter dem Einfluß hoher Gaben an Zucker findet ein Abbau des Chlorophylls aber auch der Carotinoide statt (AOKI et al. 1965; TAKASHIMA et al. 1964; ISHIKAWA et al. 1964; SCHANTZ et al. 1967). Die beiden zuletzt genannten Autoren beobachteten außerdem starke morphologische Veränderungen in der Chloroplastenstruktur. So erfolgt parallel zum Abbau der Pigmente eine Einschmelzung der Thylakoide, wobei in verstärktem Maße lipidhaltige Vakuolen auftreten. MIHARA et al. (1968) berichten ferner, daß in glukosegebleichten Chloroplasten von *Chlorella prothecoides* ein Anstieg der RNase-Aktivität festzustellen ist und damit ein Abbau von Chloroplasten RNS. Eine Erhöhung der Protease-Aktivität auf das Doppelte fanden HARRIS and KIRK (1969) bei *Euglena*, die unter hohem Zuckergehalt im Nährmedium kultiviert worden war.

Nach Auffassung von TAKASHIMA (1964) und ISHIKAWA (1964) hängt der jeweilige Pigmentationsgrad vom Verhältnis KH : N in der Zelle ab. Ist dieses Verhältnis gestört, so erfolgt ein Abbau der Primärpigmente. Dasselbe ist bei *Ankistrodesmus* zu erwarten. Unter fortlaufender Verabreichung von 0,5% Saccharose an N-haltige Normalkulturen entsteht in diesen tatsächlich eine beachtliche Menge an Astacin, das nach 13 Tagen Kulturdauer 17,7% der Gesamtcarotinoidmenge ausmachte, wogegen der Astacinanteil in der gleichaltrigen N-freien Kontrolle nur 7,3% betrug. Die Saccharose-Kultur sah gelb bis orange aus und wies eine sehr hohe Dichte auf. Angesichts dieser starken Vermehrung, war eine besonders schnelle Verarmung der Nährlösung an Nitrat zu vermuten. Messungen des Nitratgehaltes ergaben dann auch, daß in der Saccharose-Kultur schon nach 29 Std. alles Nitrat restlos aufgebraucht war, wogegen die entspre-

chende N-haltige Kontrolle ohne Saccharose erst nach 7 Tagen keine meßbaren Mengen an Nitrat mehr enthielt. Der Pigmentabbau unter dem Einfluß hoher Gaben an Zucker ist also wiederum auf einen daraus resultierenden akuten N-Mangel zurückzuführen. Der Aktivitätsanstieg der RNS- und Protein-abbauenden Enzyme in der genannten Arbeit ist dann ebenfalls als Folge eines akuten N-Mangels zu verstehen. Die Verhältnisse dürften in unseren N-Mangelkulturen wahrscheinlich recht ähnlich sein.

2. Einfluß von Glukose auf die Pigmentzusammensetzung in N-freien Kulturen

Es wurde schon wiederholt erwähnt, daß N-freie Dunkelkulturen ohne Zusatz von Zucker auch über eine Zeitspanne von 16 Tagen kein Astacin bilden. Die Kulturen bleiben normal grün; es erfolgt kein Abbau der Primärpigmente und keine Vermehrung. Selbst durch die Erniedrigung des p_H -Wertes der Nährlösung kann kein Astacin gebildet werden. -Dies steht im Gegensatz zu Kulturen im Licht, bei denen unter dem Einfluß der Acidität eine SC-Bildung induziert werden kann. Die hier ablaufende Photosynthese bzw. KH-Bildung scheint auch hier notwendig zu sein.

Es war nun interessant zu wissen, ob mit einer künstlichen Steigerung des KH-Stoffwechsels - etwa durch Zufuhr externer Glukose zu Lichtkulturen - auch die Astacinbildung gesteigert wird. Sollte eine solche Korrelation gegeben sein, so könnte man sagen, daß zwar als Ursache der SC-Bildung die Einstellung der Proteinsynthese anzusehen ist, daß aber der "Grad des N-Mangelzustands", d.h., die gebildete SC-Menge von der Konzentration der nachgelieferten KH abhängig ist.

Im Gegensatz zu den Befunden von DERSCH (1960) stellten wir tatsächlich eine additive Wirkung von Photosynthese und externer Glukosezugabe auf die Astacinbildung bei mixotropher Kultur fest (Abb. 21).

Die Astacinbildung erfährt unter Anwesenheit von 0,4% Glukose

eine beachtliche Steigerung gegenüber der Kontrolle. Entsprechend wirkt sich die Intensivierung des "Mangelzustands" auch auf den Abbau der Primärpigmente aus, wie insbesondere aus der starken Verringerung des Chlorophylls ersichtlich ist. Daß die Gesamtmenge der Xanthophylle eher einen leichten Anstieg als eine Abnahme aufweist, beruht darauf, daß das Lutein durch Glukose merkwürdigerweise eine starke Zunahme erfährt, was für die anderen Xanthophylle nicht zutrifft.

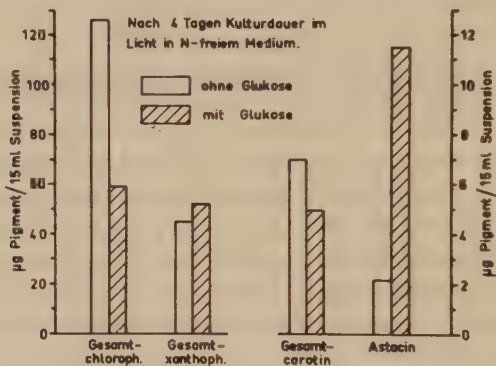


Abb. 21: Stimulierung der Astacinbildung durch Zugabe von 0,4 % Glukose nach 4 Tagen Kulturdauer in N-freien Lichtkulturen

3. Unterdrückung der Astacinbildung in Dunkelkulturen durch o-Phenanthrolin, Salicyldoxim, Dinitrophenol und Nadiäthylldithiocarbamat und der Einfluß dieser Substanzen auf die Glukoseaufnahme und den O₂-Verbrauch durch die Atmung

Es war gezeigt worden, daß durch o-Phen und Sal eine Astacinbildung in Lichtkulturen möglicherweise durch die nachgewiesene Hemmung der Photosynthese verhindert wird (Abschnitt 2, Abs. 2). Da diese Substanzen aber auch in Dunkelkulturen die durch Glukose-Zugabe ausgelöste Astacinbildung verhindern

können (Abb. 22), muß hier eine weitere Reaktion gehemmt werden. Aus Abb. 23 ist zu ersehen, daß diese Substanzen die Aufnahme des Zuckers in die Zelle unterbinden können, was die Unterdrückung der Astacinbildung erklärt.

2,4-Dinitrophenol ist ein wirksamer Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung. Bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-3}M$ blockiert DNP allerdings auch die Atmung. Nach den Untersuchungen von BOTTRILL et al. (1969) hemmt dabei das DNP die Malat-Dehydrogenase. Wie den Abbildungen 22 und 23 zu entnehmen ist, hemmt DNP in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-3}M$ zu 100 % die Astacinbildung und die Glukoseaufnahme. Es blockiert also offensichtlich in der von BOTTRILL et al. (1969) angegebenen Weise den KH-Abbau vollständig. Die Folge davon ist, daß trotz N-Mangel kein Astacin entsteht.

Na-diäthylthiocarbamat (DDC) hemmt reversibel Oxydasen, die in Sphärosomen fettspeichernder Holzstrahlzellen lokalisiert sind (SAUTER 1968). Auch für die Einführung von Sauerstoff ins Carotinoidmolekül oder die Bildung von Ketogruppen ist eine besondere Oxydase (oder Dehydrogenase) erforderlich. Eine Hemmung dieses Enzyms durch DDC müßte dabei ebenfalls zu einer Anreicherung von Vorstufen führen.

Aus Abb. 22 ist zu entnehmen, daß die genannten Substanzen die Astacinbildung mehr oder weniger stark blockieren, wobei die Primärpigmente etwa auf dem Niveau ihres Anfangswertes zu Versuchsbeginn verharren, was beweist, daß keine Schädigung der Pigmente durch die verabreichten Substanzen vorliegt.

Diese Substanzen beeinträchtigen also auch in heterotrophen Dunkelkulturen den KH-Stoffwechsel und unterdrücken somit die Astacinbildung.

Messungen der Glukoseaufnahme und des O_2 -Verbrauchs durch die Atmung ergaben, daß diese Substanzen nach längerer Einwirkungsdauer (6 Tage) gleichermaßen den Atmungsstoffwechsel hemmen. In Abb. 23 ist die Astacinbildung in Abhängigkeit von der Glukoseaufnahme dargestellt.

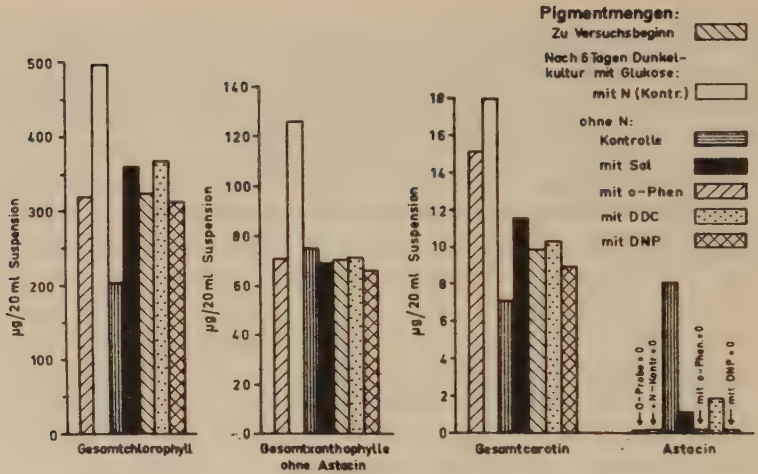


Abb. 22: Verhinderung der Astacinbildung und des Primärpigmentabbaus in glukosehaltigen N-freien Dunkelkulturen durch Sal ($2 \cdot 10^{-3}M$), o-Phen ($2 \cdot 10^{-4}M$), DDC ($4 \cdot 10^{-3}M$) und DNP ($1 \cdot 10^{-3}M$)

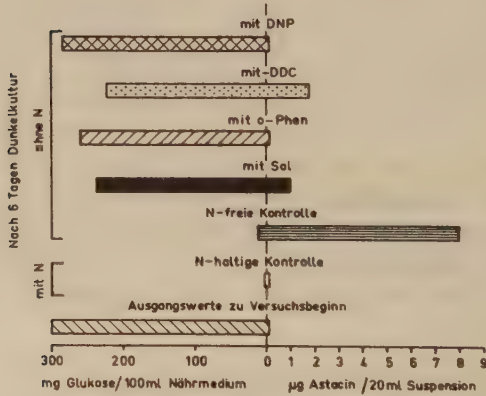


Abb. 23: Korrelation von Glukoseaufnahme und Astacinbildung: Unterdrückung der Astacinbildung bei blockierter Glukoseassimilation durch Sal ($2 \cdot 10^{-3}M$), o-Phen ($2 \cdot 10^{-4}M$), DDC ($4 \cdot 10^{-3}M$) und DNP ($1 \cdot 10^{-3}M$)

Soweit die Hemmung der Glukoseaufnahme nicht vollständig ist, entsteht jeweils eine geringe Menge an Astacin, wie z.B. in der DDC- und Sal-Kultur.

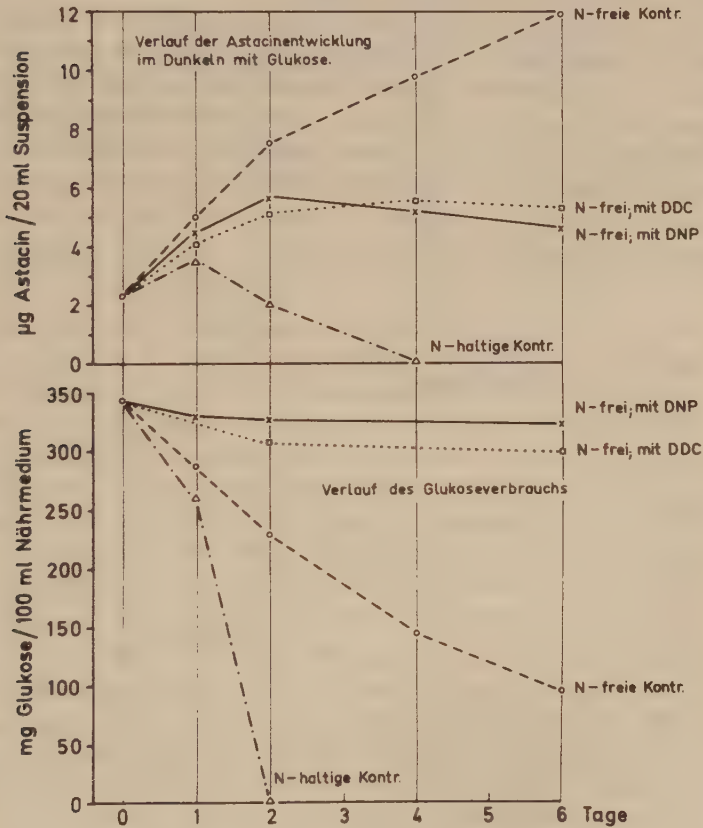


Abb. 24: Zeitliche Korrelation von Astacinentwicklung und Glukoseaufnahme in vorgemangelten, astacinhaltigen Dunkelkulturen nach Zugabe von DNP ($1 \cdot 10^{-3} \text{M}$), DDC ($4 \cdot 10^{-3} \text{M}$) und Nitrat

In Abb. 24 ist die zeitliche Korrelation von Astacinentwicklung und Glukoseaufnahme dargestellt.

In astacinhaltigen Kulturen erfolgt unter starker Glukoseaufnahme sehr rasch ein Abbau des Astacins, sofern sie mit Nitrat versorgt wurden. Unter Ausschluß von Nitratstickstoff steigt dagegen die Astacinentwicklung weiter an, wobei die Geschwindigkeit der Glukoseassimilation kleiner ist, als die der N-haltigen Kontrolle. Unter dem Einfluß von DDC und DNP erfolgt bis zum Eintritt der totalen Hemmwirkung nur noch eine sehr geringe Glukoseaufnahme, wobei die vorhandene Astacinmenge - nach einer anfänglich geringen Zunahme - auf ihrem Niveau stabilisiert.

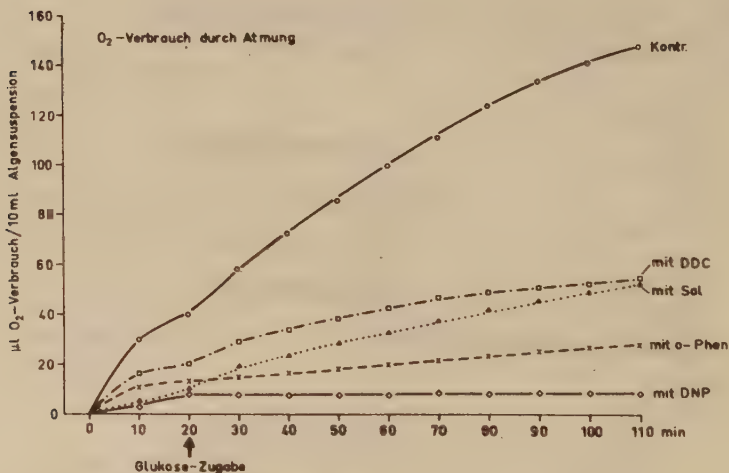


Abb. 25: Einfluß von Sal ($2 \cdot 10^{-3}M$), o-Phen ($2 \cdot 10^{-4}M$), DDC ($4 \cdot 10^{-3}M$) und DNP ($1 \cdot 10^{-3}M$) auf den Sauerstoffverbrauch durch die Atmung nach 14-stündiger Einwirkungsdauer in N-freien Kulturen

Wie aus Abb. 25 hervorgeht, ist die Hemmung des Atmungsstoffwechsel (gemessen am O_2 -Verbrauch) nach 14 Std. Einwirkungs-
dauer der applizierten Substanzen nahezu vollständig. Dies
gilt auch für Sal, welches nach den Beobachtungen von TANNER
et al. (1969) unter Entkopplerwirkung die Grundatmung (und
damit den O_2 -Verbrauch) stimuliert. Gibt man Sal und DNP in
den hier verwandten Konzentrationen unmittelbar vor der Atmungs-
messung in die Algensuspension, so ist tatsächlich ein hoher
 O_2 -Verbrauch festzustellen.

Die längere Einwirkungsdauer dieser Substanzen führt dagegen
zu einer weiteren Beeinträchtigung der Atmungsprozesse.

4. Unterdrückung der Astacinbildung durch N_2 -Begasung glukose- haltiger Dunkelkulturen

Begast man N-freie Kulturen im Dunkeln mit N_2 , so beobachtet
man selbst in Gegenwart hoher Mengen an Glukose (1 %) kaum
ein Vergilben. Die gebildete Astacinmenge nach 7 Tagen Kultur-
dauer erreicht unter N_2 -Begasung nur knapp 1/10 der Luft-
begasten Kontrolle. Dies läßt sich damit erklären, daß nach
den Befunden von KANDLER und TANNER (1966) die Glukoseauf-
nahme unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln nahezu vollstän-
dig gehemmt ist. Nur etwa 5 % der unter aeroben Bedingungen
aufgenommenen Glukose werden unter N_2 -Begasung assimiliert.
Sie sind in unserem Fall für die geringe Menge gebildeten
Astacins verantwortlich.

Noch deutlicher als bei den Hemmstoffversuchen (Abb. 22)
wird also durch N_2 -Begasung auf Grund einer verminderten
Glukoseassimilation die SC-Bildung gehemmt. Das Verbleiben
der Gesamtprimäracarotinoide auf dem Niveau des Ausgangswertes
beruht auf der erwähnten starken Luteinbildung unter diesen
Bedingungen. Ferner ist bemerkenswert, daß Kulturen, welche
7 Tage unter N_2 gehalten wurden und anschließend 12 Std.
Luft- O_2 erhielten, keine auffallende Astacinzunahme zeigen.

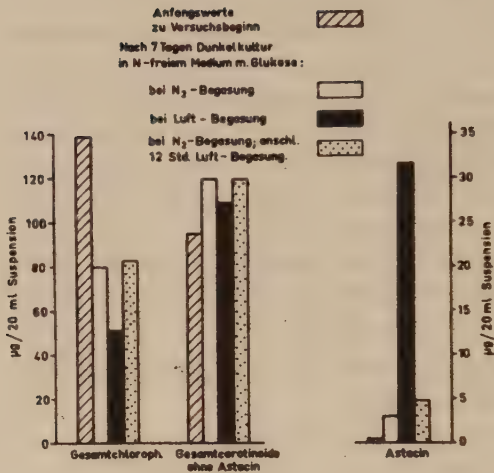


Abb. 26: Unterdrückung der Astacinbildung in glukosehaltigen Dunkelkulturen durch N₂-Begasung

Es kommt also unter anaeroben Bedingungen nicht etwa zu einem Anstau von Astacinvorstufen, die bei Anwesenheit von Luft-O₂ nun rasch zu Astacin oxydiert werden könnten.

5. Fehlen einer CAP-Wirkung in glukosehaltigen N-freien Dunkelkulturen

Im Abschnitt "SC-Synthese bei autotropher Ernährungsweise" wurden bereits die besonderen Hemmeigenschaften des Chloramphenicols (CAP) auf die Astacinbildung erläutert. Die Unterdrückung der Astacinbildung in N-freien Lichtkulturen durch CAP wurde dabei mit einer Hemmung der CO₂-Fixierung erklärt. Dieser Befund wird gleichsam bekräftigt durch die Beobachtung, daß CAP (10⁻³M) in Dunkelkulturen die Aufnahme von Glukose nicht hemmt und damit auch nicht die Astacinbildung.

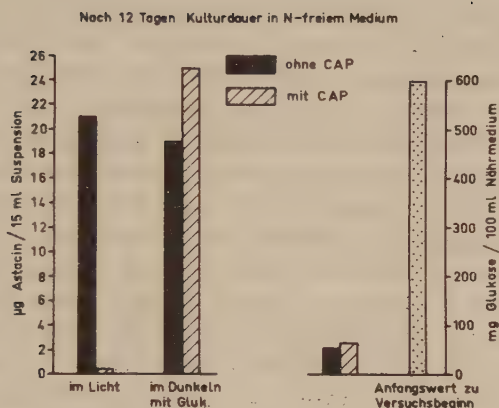


Abb. 27: Keine Hemmung der Glukoseaufnahme und Astacinbildung in Dunkelkulturen durch CAP ($10^{-3}M$)

Wie bereits erwähnt (Kap. D, Abschnitt 2, Absatz 3.2.) wirkt CAP sehr selektiv auf die Chloroplasten-Ribosomen ein. Durch die unbeeinflusste mitochondriale Atmung kann die zur Glukoseaufnahme erforderliche Energie ohne weiteres geliefert werden. Wie die Atmungsmessungen gezeigt haben, ist selbst bei 140-stündiger CAP-Einwirkung die O_2 -Aufnahme völlig ungestört.

CZYGAN (1964b) untersuchte bereits den Einfluß von CAP auf die SC-Bildung in N-freien Lichtkulturen und stellte dabei fest, daß diese Substanz die SC-Bildung unterdrückt. CZYGAN zog daraus den Schluß, daß CAP wahrscheinlich direkt die Biosynthese der SC blockiert. Wie aber der Versuch zeigt, hat CAP auf die eigentliche Biosynthese der SC keinen Einfluß. Das Ausbleiben der SC-Bildung in N-freien Lichtkulturen mit CAP beruht nach unseren Befunden auf einer Hemmung der CO_2 -Fixierung (siehe Kap. D, Abschnitt 2, Abs. 3.2.) und damit auf einer Ausschaltung des KH-Stoffwechsels.

6. Kurze Diskussion

Alterungsprozesse sind zumeist gekennzeichnet durch Umstellungen im Stoffwechsel. Die Verminderung bzw. gänzliche Einstellung der Proteinsynthese spielt dabei eine wesentliche Rolle. Auch die unter N-Mangel auftretende SC-Bildung könnte in diesem Sinne als ein Alterungsprozeß aufgefaßt werden. Daß es sich aber hierbei nicht nur um einen autonomen Umstrukturierungsvorgang handelt, der durch N-Mangel allein ausgelöst wird, zeigten die eben beschriebenen Versuche. Da N-freie Kulturen im Dunkeln ohne Zusatz von Glukose weder einen Abbau der Primärpigmente noch eine Bildung von Astacin zeigen, folgt zwangsläufig, daß für diese Art von Alterungsprozeß außer N-Mangel auch noch die Tätigkeit des KH-Stoffwechsels oder besser die Zufuhr von KH erforderlich ist. Bei totaler oder partieller Hemmung der Photosynthese in Lichtkulturen oder bei blockierter Glukoseaufnahme in Dunkelkulturen ist nämlich dieser Prozeß entsprechend eingeschränkt.

Es stellt sich nun die Frage, welche Bedeutung dem KH-Stoffwechsel für die SC-Bildung zukommt. Die N₂-Begasung N-freier Lichtkulturen zeigte, daß die Bedeutung des KH-Stoffwechsels nicht in einer Versorgung mit Energie für die Astacinbildung besteht. Es muß also ein Umsatz von C-Körpern stattfinden, damit SC erscheinen. Da aber ferner die Bildung von SC an die Einschmelzung der Thylakoide gebunden ist (Primärpigmentabbau!) muß wohl an eine Verknüpfung von KH-Stoffwechsel und Strukturproteinabbau gedacht werden. Genauere Vorstellungen werden in der Schlußdiskussion aufgezeigt.

7. Zusammenfassung

1. N-Mangel führt zu einer Verminderung der Zellteilung. In heterotrophen Kulturen tritt der Teilungsstillstand früher ein, als in autotrophen. N-Mangelzellen nehmen an Volumen zu, wobei eine starke Anhäufung von Lipiden zu verzeichnen ist.

2. Die Photosyntheseleistung nimmt unter N-Mangel nicht in dem selben Maße ab wie das Chlorophyll. Die pro mg Chlorophyll produzierte O₂-Menge ist in chlorophyllarmen Mangelkulturen sogar größer als in chlorophyllreichen Normalkulturen.
3. Bei blockierter Photosynthese durch DCMU oder andere Hemmstoffe erfolgt kein Abbau der Primärpigmente und keine Bildung von Astacin.
4. In Dunkelkulturen unterbleibt die Astacinbildung und der Primärpigmentabbau
 - a) bei Fehlen von externer Glukose
 - b) bei blockierter Glukoseaufnahme durch Hemmstoffe (o-Phenanthrolin, Salicylaldehyd, Dinitrophenol, Natriäthylthiocarbamat) oder N₂-Begasung
 - c) bei Atmungshemmung durch die unter b) genannten Substanzen.
5. Die Verstärkung des KH-Umsatzes durch Zugabe von Glukose zu N-freien Lichtkulturen bewirkt eine verstärkte Astacinbildung gegenüber der N-freien Kontrolle.
6. Das Vergilben der Zellen in N-haltigen Normalkulturen durch Saccharose beruht auf einer sehr schnellen Nitratverarmung infolge der gesteigerten Vermehrung.
7. CAP hemmt in N-freien Lichtkulturen die Astacinbildung. Die Hemmwirkung beruht auf der Blockierung der CO₂-Fixierung. Sie kann durch Zugabe von Glukose aufgehoben werden.
8. Die Versorgung N-freier Kulturen mit Energie (über die cyclische Photophosphorylierung) führt noch zu keiner Astacinbildung.
9. Eine enge Verknüpfung von KH-Umsatz und Thylakoideinschmelzung (unter N-Mangel) wird als Voraussetzung für die SC-Bildung postuliert.

E. UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOGENESE DES ASTACINS

1. Einleitung

Neben der Auffindung von Kausalbeziehungen zwischen N-Mangel und SC-Bildung wurde außerdem noch der Versuch unternommen, etwas über die Biogenese des Astacins in Erfahrung zu bringen. Unsere Kenntnis über die Biogenese der Xanthophylle, d.h. über den Einbau von Sauerstoff in das Carotinoidmolekül ist noch weitgehend hypothetisch.

Versuche, ^{14}C -markierte Carotinoide als potentielle Vorstufen zu verfüttern, unterliegen großen Schwierigkeiten, da im Biosyntheseweg von der Mevalonsäure an die Chloroplastenmembran für diese Isoprenkörper impermeabel ist (TREHARNE et al. 1966; WIECKOWSKI et al. 1967). Unsere Untersuchungen zur Biogenese des Astacins mußten sich daher auf Grundsätzliches beschränken, z.B. auf die Frage, ob die Synthese des Astacins über die bekannten Primärxanthophylle verläuft. Mittels Isotopenmarkierungen sollte ferner überprüft werden, ob entsprechend den Vorstellungen von CZYGAN (1968b) Chlorophyllabbauprodukte als C-Körper für die SC-Synthese in Frage kommen oder ob die SC über den regulären Biosyntheseweg aus neuen Isopreneinheiten aufgebaut werden.

2. Mengenbeziehungen zwischen Astacin und Trihydroxy- α -carotin

2.1. Trihydroxy- α -carotin als mögliche Vorstufe des Astacins

Bereits aus stöchiometrischen Überlegungen (Kap. C, Abs. 3) ist eine direkte Umwandlung von Chlorophyllabbauprodukten in SC wenig wahrscheinlich. Man muß daher annehmen, daß Astacin entweder über den regulären Carotinoidbiosyntheseweg - ausgehend vom Acetat - gebildet wird, oder durch Oxidation vorhandener Carotinoide.

Ein sauerstoffreiches Xanthophyll könnte dabei als unmittelbare Vorstufe in Frage kommen. Im Laufe unserer Versuche fiel auf, daß Änderungen des Astacingehaltes auch jeweils von auffälligen Veränderungen der Trihydroxycarotinoidmenge begleitet wurden. Dieses Verhalten zeigte in so ausgeprägtem Maße keines der übrigen Xanthophylle.

Wie aus Abb. 28 zu ersehen ist, nimmt das Trihydroxycarotin bei N-Mangel am stärksten ab, wogegen es bei unterdrückter Astacinbildung durch o-Phen nur eine geringe Abnahme erfährt.

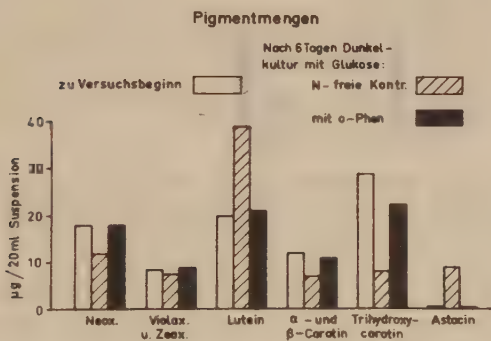


Abb. 28: Mengenänderungen der Primärcarotinoide und des Astacins nach 6 Tagen Dunkelkultur mit Glukose

2.2. Kurzzeitige Korrelation der Mengenänderungen von Trihydroxy- α -carotin und Astacin

Sollte Trihydroxycarotin als unmittelbare Vorstufe des Astacins wirklich in Frage kommen, so müßte eine kurzzeitige Stimulierung des Astacins mit einer sofortigen Abnahme des Trihydroxycarotins verbunden sein. In Gegenwart von 3,5 % Glukose werden bereits innerhalb von 48 Std. beachtliche Mengen Astacin synthetisiert. Wie aus Abb. 29 ersichtlich ist, reagiert das Trihydroxy-

carotin tatsächlich sofort mit einer auffälligen Abnahme, die allerdings größer ist, als die Astacinneubildung.

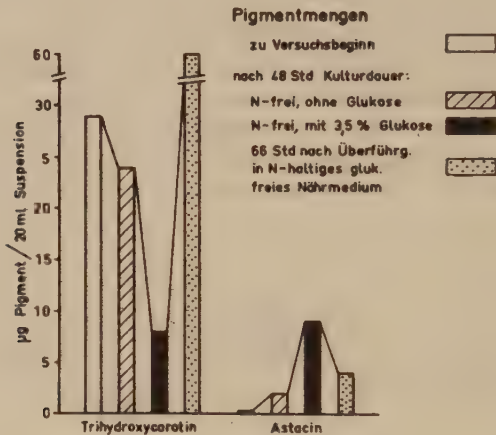


Abb. 29: Kurzzeitige Mengenänderungen von Trihydroxycarotin und Astacin unter der stimulierenden Wirkung von Glukose

Nach Überführung der stimulierten Kultur in N-haltiges glukose-freies Medium wird die Astacinbildung eingestellt und es kommt zu einem ungewöhnlich starken Anstau von Trihydroxycarotin (Abb. 29). Man könnte sich dies so erklären, daß die während der Glukoseinkubation verstärkt synthetisierten Carotinoid-vorstufen nun plötzlich nicht mehr zu Astacin verarbeitet werden können, so daß daraus zwangsläufig ein augenblicklicher Anstau der Astacinvorstufe nämlich des Trihydroxycarotins resultiert. In Abb. 30 sind die kurzzeitigen Mengenänderungen sämtlicher Primärcarotinoide und des Astacins als Kinetik dargestellt. Von allen Primärcarotinoiden weist dabei das Trihydroxycarotin die stärksten Mengenänderungen auf. 6 Std. nach Überführung der N-Mangelkultur in ein N-haltiges Medium steigt das Trihydroxycarotin nahezu linear steil an und über-gipfelt sogar das mengenmäßig stets dominierende Lutein.

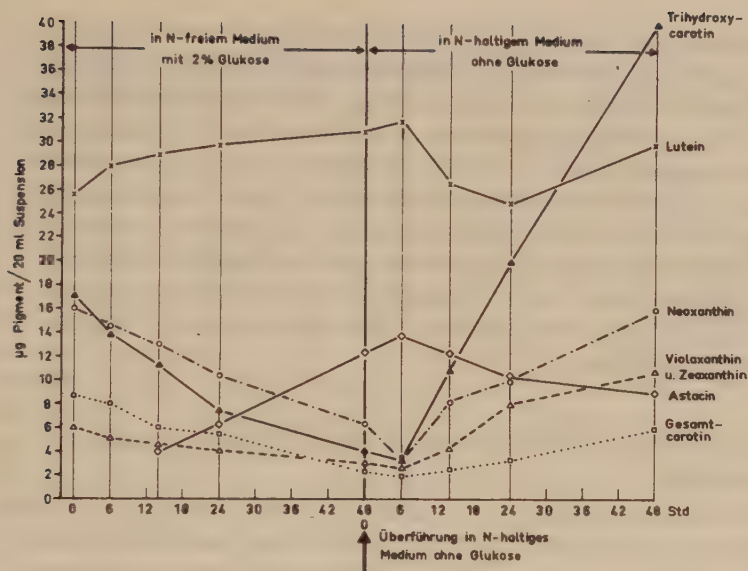


Abb. 30: Kinetik der Mengenänderungen der Primärcarotinoide und des Astacins bei 48-stündiger Kultivierung in N-freiem Medium mit 2 % Glukose und anschließender Überführung in N-haltiges glukosefreies Medium

Diese auffallenden Mengenänderungen des Trihydroxycarotins sprechen bereits für eine nahe Vorstufe des Astacins. Für diese Annahme spricht auch weiterhin die Tatsache, daß nach den Befunden von STRANSKY (1969) das Trihydroxycarotin nur in solchen Algen zu finden ist, die auch zur SC-Bildung befähigt sind. Allerdings gelang es bis jetzt noch nicht die exakte Struktur, d.h. die Lage der Sauerstofffunktion im Molekül restlos zu klären. Nach dem Strukturvorschlag von STRANSKY soll es sich hierbei um ein α -Carotinderivat handeln mit einer zusätzlichen 3. OH-Gruppe am α -Iononring (3, 3', 4-Trihydroxy-5, 6-Dihydro- α -Carotin). Die Umwandlung dieses Carotinoids zu Astacin bedürfte also lediglich der weiteren Einführung einer OH-Gruppe bei gleichzeitiger Oxydation der

OH-Gruppen und Lageänderung der Doppelbindung im α -Iononring. AITZETMÜLLER et al. (1969) machten jedoch in jüngster Zeit einen anderen Strukturvorschlag. Nach ihren Untersuchungen soll das Trihydroxycarotin ein Hydroxy-Lutein darstellen. Dabei wird die Position der 3. OH-Gruppe nicht am β -Iononring sondern an einer Methylgruppe der Isoprenkette angenommen. Diese Struktur wäre allerdings als Astacinvorstufe kaum denkbar. Ob der auf Grund unserer Befunde angenommene biogenetische Zusammenhang von Trihydroxycarotin und Astacin möglich ist, muß die endgültige Klärung der eingebrachten Strukturvorschläge ergeben.

3. Versuche mit verschiedenen "Hemmstoffen der Carotinoid-synthese"

Zur Klärung der Frage, ob das Astacin durch Umwandlung bereits vorhandener Primäracarotinoide entsteht oder ganz de novo aus Acetateinheiten aufgebaut wird, suchten wir nach einschlägigen Hemmstoffen, welche die Carotinoidsynthese blockieren. Sollte Astacin de novo gebildet werden, so dürfte bei einer wirksamen Hemmung des Biosyntheseweges zwischen der Mevalonsäure und dem β -Carotin unter N-Mangel kein Astacin entstehen, wohl aber wenn nur die bereits vorhandenen Primärxanthophylle umgewandelt werden.

Verschiedene Substanzen, welche als Hemmstoffe der Carotinoidsynthese in der Literatur angegeben werden, erwiesen sich jedoch nicht als spezifisch. Nach den Angaben von RANNEBERG et al. (1968) wirkt das Mutagenz Äthylmethansulfonat bei Chlamydomonas reinhardi kaum mutierend, soll aber die Carotinoidbildung stark hemmen. Die genauere Untersuchung ergab jedoch, daß die Hemmwirkung dieser Substanz auf der Erhöhung der H^+ -Iononkonzentration im Nährmedium beruht. Bei 8 - 12-stündiger Einwirkung sinkt der pH-Wert von 6,9 auf 3,0.

Denselben Effekt zeigt die Verbindung α -Hydroxy-2-pyridinmethansulfonat, das nach SHAH et al. (1968) den Einbau von $^{14}CO_2$ in β -Carotin hemmt. Stellt man den abgesunkenen pH-Wert immer wie-

der auf 7,0 ein, so erfolgt im Gegensatz zur nicht korrigierten Kontrolle die Pigmententwicklung völlig normal. Carotinoidbiosynthesestudien mittels ^{14}C markierter Mevalonsäure von REYES et al. (1964) an *Phycomyces blakesleeana*s zeigten, daß bestimmte Hemmstoffe der Steroidsynthese, nämlich SKF 525-A (ß-diäthylaminoäthyl diphenylpropylacetat) und Benzmalecin (N-(1-methyl-2-3-di-p-chlorophenylpropyl)meleamsäure) spezifisch die Carotinoidsynthese blockieren. SKF 525 A soll die Isomerisierung des Isopentenyl-PP zu Dimethylallyl-PP verhindern und Benzmalecin die Phosphorylierung der Mevalonsäure. Ein weiterer Hemmstoff der Steroidbiosynthese das Triparanol, MER-29, 1-(4-(diäthylaminoäthoxy)phenyl)-1-(p-tolyl)-2-(p-chlorophenyl)-äthanol, soll zwischen dem Isopentenyl-PP und dem Squalen eingreifen (DORFMAN 1963).

Wir testeten die 3 genannten Hemmstoffe eingehend und stellten fest, daß Benzmalecin in *Ankistrodesmus* keinerlei Hemmwirkung auf die Carotinoidsynthese ausübt.

Triparanol und SKF 525-A bewirken im Licht ein Ausbleichen der Kulturen. Im Dunkeln wird zwar die Astacinbildung mehr oder weniger stark gehemmt, allerdings auch die Glukoseaufnahme. Die spezifische Hemmwirkung dieser Substanzen muß daher in Frage gestellt werden. Das Fehlen eines spezifischen Hemmstoffes der Carotinoidsynthese ohne Nebenwirkung erlaubt es vorerst nicht, das Problem der Astacinsynthese auf diese Weise zu klären.

4. Qualitative Studien an Pigmentmutanten

Da uns die Experimente mit "Hemmstoffen der Carotinoidsynthese" im Studium der Astacinbiogenese nicht weiter führten, hofften wir durch die Herstellung geeigneter Pigmentmutanten diesem Problem näher zu kommen. Die Selektion der Mutanten wurde vornehmlich nach dem Aufsuchen von zwei gewünschten Eigenschaften betrieben. Einmal sollte versucht werden, Mutanten zu erzeugen, welche chlorophyllfrei oder wenigstens chlorophyllarm sind aber die Fähigkeit zur Astacinbildung besitzen.

Träte eine solche Mutante in Erscheinung, so könnten Chlorophyllabbauprodukte nicht als Substrat für die Astacinbildung in Frage kommen, so wie es CZYGAN (1968b) fordert. Ferner waren Varietäten erwünscht mit ungestörter Primärcarotinoidsynthese, aber mit fehlender oder verminderter Fähigkeit zur Astacinbildung. Es sollte untersucht werden, ob diese Formen unter N-Mangel eventuell einen Anstau von Trihydroxycarotin aufweisen.

Zur Herstellung von Pigmentmutanten wurden verschiedene Verfahren erprobt:

1. Bestrahlung mit UV-Licht eines Quecksilber-Niederdruckbrenners mit einem hohen Strahlenanteil der Wellenlänge 254nm. Eine sehr dünne Algensuspension wurde auf Vollmedium-Agar mit Glukose- und Peptonzusatz ausplattiert und 10 sek. bis 2 min. lang im Abstand von 50 cm bestrahlt.
2. Inkubation mit den Mutagenzien 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin und Äthylmethansulfonat. Die Algen wurden mit Konzentrationen von 50 bis 500 g/ml dieser Mutagenzien 10 bis 120 min. lang inkubiert, anschließend abzentrifugiert und zweimal gewaschen. Ein Tropfen der stark verdünnten Suspension wurde dann ausplattiert.

Es zeigte sich, daß nach 8 - 14 Tagen einzelne Kolonien verschiedenen Pigmentierungsgrades auftraten und zwar von intensiv grün über hellgrün, braun bis zu gelb. Alle mutationsverdächtigen Kolonien wurden zur Vermehrung in kleine Kulturkölben überführt und auf der Schüttelmaschine weiterkultiviert.

In einem einzigen Fall gelang es eine nahezu chlorophyllfreie gelbe Varietät zu erzeugen, welche als Primärpigmente nur Lutein und etwas β -Carotin enthielt. Ihre Vermehrung erfolgte jedoch sehr langsam. Nach Überführung in N-freies Medium bildete sie kein Astacin. Möglicherweise war in dieser Mutante bereits ein Teil der Carotinoidsynthese blockiert, da außer β -Carotin und Lutein keines der übrigen Xanthophylle auftrat. Es wäre aber auch denkbar, daß von vornherein der Auf-

bau der Thylakoiode gestört war, wie es die zögernde Vermehrung auf Grund einer stark herabgesetzten Proteinsynthese nahelegt. Aber auch die Hemmung der Chlorophyllsynthese könnte als Ursache für die Unterdrückung der Thylakoidbildung in Betracht kommen. Nach den Untersuchungen von OHAD et al. (1968) soll nämlich zwischen der Biosynthese des Chlorophylls und der Bildung der Thylakoidstrukturproteine ein Regulationsmechanismus bestehen. FALK (1969) konnte glaubhaft machen, daß die Synthese der Strukturproteine direkt an den thylakoidgebundenen Ribosomen stattfindet. Er nimmt an, daß zur Entfernung der Polypeptidkette von den Ribosomen ein Chlorophyll-Protein-Komplex erforderlich sein könnte, der dann gleich in das Thylakoid eingebaut wird. Chlorophyllarme gelbe Mutanten dieser Art würden also in der Ausbildung der Thylakoide a priori einem späten N-Mangelstadium entsprechen.

Die Abhängigkeit der Thylakoidentwicklung von der Pigmentierung besteht aber nicht nur in Bezug auf das Chlorophyll, sondern offensichtlich auch in Bezug auf die Carotinoide, Verschiedene Autoren (WALLES 1966; FALUDI et al. 1968; RÖBBELEN 1966; GOODENOUGH et al. 1969) konnten zeigen, daß zur Aufrechterhaltung des normalen Lamellarsystems der ungestörte Ablauf der Carotinoidsynthese erforderlich ist. Mutanten, bei denen die Carotinoidsynthese gestört ist, zeigen auch eine anormale Granabildung.

Aus diesen Befunden ist zu entnehmen, daß in Mutanten mit gestörter Pigmentsynthese auch die normale Thylakoidentwicklung gestört ist. Der eigentliche entwicklungsphysiologische Prozeß der allmählichen Thylakoideinschmelzung bei gleichzeitig ungestörtem KH-Stoffwechsel - so wie wir ihn als Voraussetzung für die Astacinbildung postulieren - könnte daher auch hier gar nicht stattfinden. Diese Tatsache sei deshalb betont hervorgehoben, weil auch CZYGAN (1968b) gelbe *Ankistrodesmus*-Mutanten studierte und aus ihrem Unvermögen zur Astacinbildung folgerte, daß zur SC-Bildung Chlorophyllabbauprodukte zur Verfügung stehen müßten.

Neben der genannten gelben Form konnten eine Reihe anderer Varieten isoliert werden, die sich in der Pigmentzusammensetzung und in ihrer Fähigkeit zur Astacinbildung von der Normalform erheblich unterscheiden. In Abb. 31 ist das Chromatogramm der Pigmentextrakte von 3 verschiedenen Mutanten im Schema wiedergegeben.

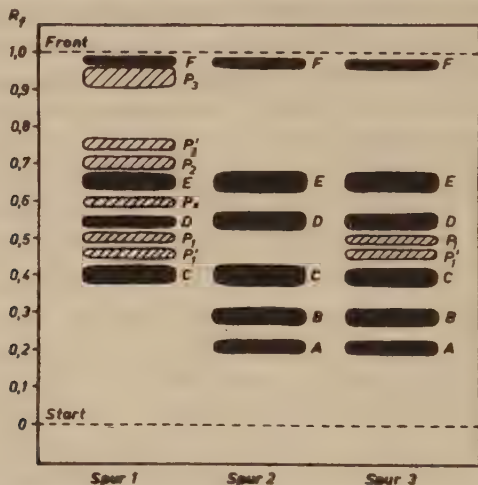


Abb. 31: Dünnschichtchromatogramm der Pigmentextrakte von 3 verschiedenen Farbstoffmutanten nach 30 Tagen Kulturdauer in N-freiem Medium mit Glukosezusatz:

Spur 1: grün-braune Mutante; Auftreten zusätzlicher Astacinester P₁', P_x und P₂'

Spur 2: intensiv grüne Mutante ohne Primärpigmentabbau und Astacinester

Spur 3: hellgrüne Mutante; relativ pigment-schwach; Astacinester nur in P₁ und P₁'

A = Neox.;

B = Violax. und Trihydroxycarotin;

C = Lutein und Zeax.;

D = Chlorophyll b;

E = Chlorophyll a;

F = α- und β-Carotin

Spur 1 zeigt die Pigmentzusammensetzung einer grün-braunen Mutante (Nitrosoguanidin $50 \mu\text{g/ml}$, 120 min). Es ist eine verstärkte Astacinbildung zu beobachten, wobei noch 3 zusätzliche Astacinester auftreten. Die Primärxanthophylle Neox., Violax., und Trihydroxycarotin sind gänzlich verschwunden, wogegen das Lutein noch relativ stark vertreten ist. Diese Mutante weist bereits unter N-haltigen Normalbedingungen Astacin in P_1 auf, wobei die genannten Primärxanthophylle nur schwach ausgebildet sind. Es ist recht wahrscheinlich, daß bei dieser Mutante die Proteinsynthese teilweise gestört ist, möglicherweise schon auf dem Niveau der Stickstoffreduktion. Da der KH-Umsatz offenbar ungestört im vollen Umfang ablaufen kann (verstärkte Lipidbildung, Auftreten zusätzlicher Ester) und die Zellen aber schon im N-haltigen Medium bereits unter einer Art N-Mangel stehen (gestörte Nitratassimilation, Astacin in P_1) kommt es zu der bekannten "Zuckerbleichwirkung" mit starker Astacinbildung.

In Spur 2 sind die Pigmente (1,5 min UV-Strahlung) einer Mutante aufgetrennt, welche sich bereits auf dem Agar-Nährboden durch eine intensive Grünfärbung stark von den übrigen Kolonien unterschied. Bei diesem Stamm trat selbst nach 30 Tagen Kulturdauer in N-freiem Medium mit Glukose kein Astacin auf. Allerdings erfolgte auch kein Abbau der Primärpigmente, die Kultur blieb normal grün. Man muß wohl annehmen, daß bei diesem Stamm eine Blockierung der lysosomalen Prozesse vorliegt. Dieses Beispiel zeigt gut, daß N-Mangel erst dann zur SC-Bildung führt, wenn auch ein Abbau der Thylakoide stattfinden kann. Spur 3 gibt die Pigmente einer hellgrünen, insgesamt pigment-schwachen Varietät wieder. Der Abbau der Primärpigmente unter N-Mangel erfolgt nur sehr zögernd und es erscheint dementsprechend nur wenig Astacin in P_1 und P_1' . Sehr wahrscheinlich liegt auch hier eine Beeinträchtigung der lysosomalen Prozesse vor. Es könnte aber auch eine Störung des KH-Stoffwechsels in Frage kommen, da eine Lipidanhäufung kaum zu beobachten ist (Fehlen der Ester P_2 und P_3). Auf die Notwendigkeit der ungestörten Funktion des KH-Stoffwechsels für die Astacinbil-

dung ist bereits wiederholt hingewiesen worden.

5. Alterung und Sekundärcarotinoidbildung: Einfluß von Kinetin und Gibberellinsäure

Die unter N-Mangel auftretende SC-Bildung kann als Symptom eines Alterungsprozesses gedeutet werden. Die während dieses Prozesses ablaufenden stofflichen Veränderungen in der Zelle müssen dabei in einem biogenetischen Zusammenhang mit der SC-Bildung stehen.

Die Untersuchungen, die über den Mechanismus von Alterungsvorgängen (Seneszenz) vorliegen, könnten nun für die Erklärung der N-Mangelwirkung auf die SC-Bildung nutzbar gemacht werden, wenn sich nachweisen ließe, daß N-Mangel und Seneszenz identisch sind. Eine solche Identität besteht beispielsweise in der Aktivierung verschiedener lysosomaler Enzyme (RNase, Proteasen, Phosphatasen, Peroxydasen, Transaminasen) wie sie von UDVARDY et al. (1969) und HOROVITZ et al. (1968) bei Alterung und N-Mangel beobachtet wurden, also unter Bedingungen, welche zum Primärpigmentabbau und zur SC-Bildung führen.

Eine weitere Möglichkeit zur Klärung dieser Frage bieten Versuche mit den Phytohormonen Kinetin und Gibberellinsäure, von denen bekannt ist, daß sie Alterungsvorgänge charakteristisch beeinflussen. Experimente mit Kininen ergaben, daß sie verzögernd auf die Seneszenz einwirken. Abgetrennte grüne Pflanzenorgane, welche mit Kinetin behandelt wurden, blieben noch über einen längeren Zeitraum grün, wogegen die nichtbehandelten Kontrollen rasch vergilbten. Diese Seneszenzverzögerung beruht auf einer Stimulierung der RNS- und Proteinsynthese in der alternierenden Zelle (HESS 1968).

Gibberellinsäure (GS) wirkt gerade in die entgegengesetzte Richtung. Sie beschleunigt den Alterungsvorgang durch Aktivitätssteigerung hydrolytischer Enzyme, u.a. auch der RNasen und Proteasen (COHEN et al. 1969; HESS 1968).

Es schien uns nützlich zu erfahren, ob diese beiden Phytohormone in derselben Weise auch auf N-Mangelkulturen von Anki-

strodesmus einwirken, was sich in einer Verzögerung bzw. Stimulierung der Astacinbildung zu erkennen geben müßte. Die Einwirkung von Kinetin ($6 \cdot 10^{-4}M$) führte tatsächlich zur deutlichen Verzögerung des Primärpigmentabbaus und zu einer schwächeren Astacinbildung, jedoch konnte diese nicht ganz verhindert werden. Ebenso äußerte sich die Zugabe von Gibberellinsäure ($6 \cdot 10^{-4}M$) in einer auffallenden Stimulierung des Primärpigmentabbaus (dargestellt am Chlorophyll in Abb. 32) und der Astacinbildung.

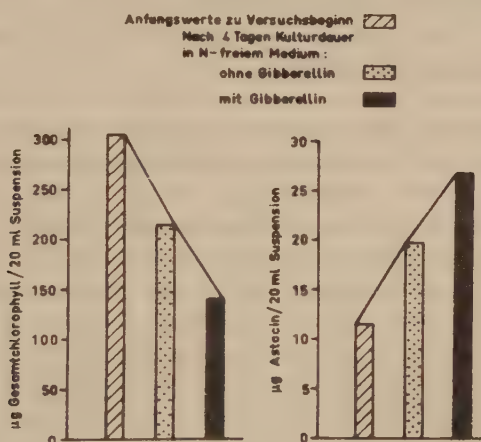


Abb. 32: Stimulierung des Chlorophyllabbaus und der Astacinbildung durch Gibberellin ($6 \cdot 10^{-4}M$) in N-freien Kulturen

Zusätzlich traten bereits nach 4 Tagen Kulturdauer große Lipidmengen auf, so wie man sie erst in einem späten N-Mangelstadium beobachten kann. Es könnte also eine verstärkte Bildung osmiophiler Globuli stattgefunden haben, die aber nur dann entstehen, wenn gleichzeitig Strukturproteine abgebaut werden. Dieser Abbau setzt aber eine Steigerung der lysosomalen Enzymaktivitäten voraus. Es geschieht also das Entgegengesetzte wie bei Kinetinzugabe. Aus dem Verhalten einer N-Mangelkultur gegenüber GS läßt sich folgern, daß die Steigerung des Primär-

pigmentabbaus und der SC-Bildung die Steigerung der lysosomalen Enzymaktivitäten zur Voraussetzung hat. Sehr wahrscheinlich besteht nun auch der biogenetische Zusammenhang zwischen N-Mangel und SC-Bildung primär in der Steigerung der lysosomalen Enzymaktivitäten, welche zum Thylakoidabbau und damit zur Verminderung der Primärpigmente führen.

6. Isotopenmarkierungsversuche zur Frage der SC-Bildung aus Abbauprodukten des Chlorophylls

6.1. Allgemeine Bemerkungen

Die nachstehend beschriebenen Versuche hatten vornehmlich das Ziel, durch Isotopenmarkierungen herauszufinden, ob Chlorophyllabbauprodukte als Bausteine für das Astacin in Frage kommen. Dabei wurde von der Annahme ausgegangen, daß nach vorangegangener ^{14}C -Markierung des Chlorophylls im N-haltigen Medium und anschließender Überführung in N-freies Medium, das entstehende Astacin eine ähnliche spezifische Aktivität haben müßte wie das Chlorophyll. Die spezifischen Aktivitäten des Chlorophylls und Astacins sollten ferner über den ganzen Zeitraum der Astacinbildung konstant sein. Wird diese Forderung nicht erfüllt, so muß man annehmen, daß Chlorophyllabbauprodukte als Astacinbausteine nicht in Frage kommen. Die Astacinbildung kann dann nur aus neuen Acetateinheiten, d.h. de novo erfolgen oder aus vorhandenen Carotinoiden.

6.2. Methode

Eines der Hauptprobleme bei der ^{14}C -Markierung von Carotinoiden ist die Reinigung der Farbstoffe von Fremdaktivitäten. Da Isoprene mit mehr als 5 C-Atomen die Chloroplastenmembran bereits nicht mehr passieren können (TREHARNE et al. 1966; WIECKOWSKI et al. 1967), so kommt als Fütterungssubstrat nur $^{14}\text{CO}_2$ oder 2- ^{14}C -Mevalonsäure in Frage. Beide Substrate führen

aber zu einer starken Streuung der Radioaktivität, die durch die verstärkte Lipidbildung unter N-Mangel noch gefördert wird. Die Einbauraten sind dementsprechend gering (unter 1 %). Die Entfernung der radioaktiven Verunreinigungen aus den Carotinoiden erfordert daher gut ausgearbeitete Reinigungsverfahren. Das beste Reinigungsverfahren wäre die kristalline Darstellung der Carotinoide. Dazu wäre aber die 100-fache Pigmentmenge nötig, die uns normalerweise zur Verfügung stand, was auf gewinnungstechnische Schwierigkeiten stößt. In den bisher referierten Markierungsversuchen beschränkte man sich daher in den meisten Fällen auf die chromatographische Reinheit der Pigmente. Diese genügt jedoch nur, wenn nach mehrfacher chromatographischer Reinigung die spezifische Aktivität konstant bleibt. Da aber Chlorophylle und Carotinoide photolabile Verbindungen sind, so besteht die Gefahr, daß bei wiederholter Chromatographie ein Teil der Pigmente für die photometrische Messung verloren geht, wodurch die Berechnung der spez. Aktivität verfälscht werden kann. Die genannten Fehlerquellen sind daher stets zu berücksichtigen, wenn man aufgrund von Aktivitätsunterschieden differenzierte Aussagen machen möchte.

Unsere Markierungsversuche wurden in einem offenem System durchgeführt. An radioaktiven Substanzen verwendeten wir 5-Aminolaevulinsäure-4- ^{14}C -Hydrochlorid (^{14}C -ALS) zur spezifischen Markierung von Chlorophyll und 2- ^{14}C -Mevalonsäure (^{14}C -MVS) bzw. ^{14}C -Hydrogencarbonat zur Markierung von Carotinoiden. Die Substanzen werden den luftbegasteten Algensuspensionen appliziert. Dem "heißen" Kulturkolben wurde eine Waschflasche mit Kalilauge nachgeschaltet, um entweichendes $^{14}\text{CO}_2$ abzufangen. Bei den ersten Markierungsversuchen zeigte sich, daß bei normal grünen Kulturen von mittlerer Dichte praktisch kein Einbau von ^{14}C -ALS und ^{14}C -MVS in die Pigmente erfolgt. Ein meßbarer Einbau dieser Verbindungen ist nur dann zu beobachten, wenn die Algen eine intensive Pigmentsynthese betreiben. Dies ist der Fall:

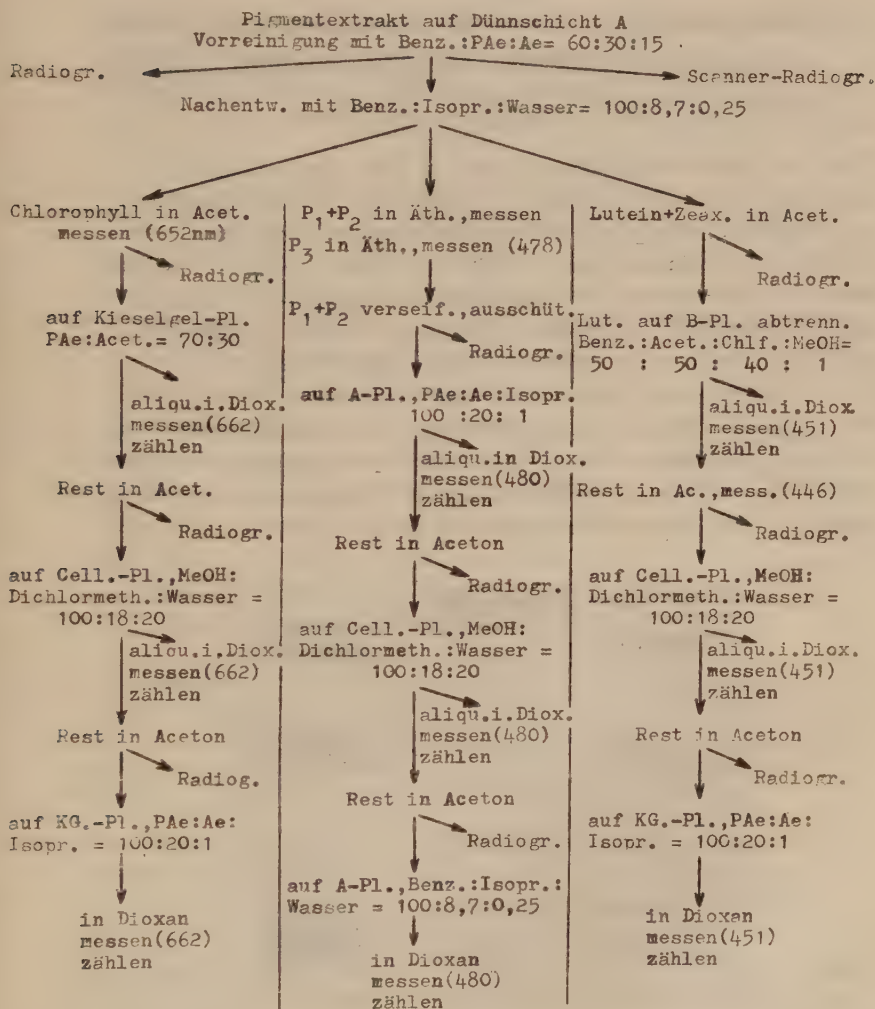
a) in der logarithmischen Vermehrungsphase

b) während der Pigmentrestitution gemangelter Zellen in N-haltigem Nährmedium.

Der radioaktive Pigmentextrakt wurde dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und anschließend im Dünnschicht-Scanner auf Markierung untersucht (Scanner-Radiogramm). Ein zweites Chromatogramm wurde zur Herstellung eines Autoradiogrammes auf Agfa-Röntgenpapier gelegt und nach 14 Tagen bis 3 Wochen entwickelt. Aus dem Scanner-Test ist bereits ersichtlich, ob die einzelnen Pigmentzonen für die weitere Reinigung und Radioaktivitätsbestimmung genügend stark markiert sind. Zur quantitativen Erfassung der eingebauten Radioaktivität wurden die einzelnen Pigmentzonen mehrfach chromatographisch gereinigt. Hierzu wurde ein spezielles Reinigungsverfahren ausgearbeitet, wobei es darauf ankam, durch Änderung der Beschichtung und Laufmittelszusammensetzung, eine Abtrennung störender Fremdaktivitäten zu erreichen. Zur Kontrolle wurden für jeden Reinigungsschritt zusätzlich Radiogramme angefertigt. Die Anwesenheit von Fremdaktivität wurde dabei durch das Auftreten von 2 radioaktiven Banden aufgezeigt. Nach jedem Reinigungsschritt gelangte ferner ein aliquot des Farbstoffes sofort zur Messung, um festzustellen, ob sich die spez. Aktivität noch verändert. Die angewandten Reinigungsverfahren sind auf S. 87 zusammengefaßt dargestellt.

Zur Radioaktivitätsbestimmung wurden die Pigmente in Dioxan eluiert, im Spektrophotometer gemessen und anschließend in einem Flüssigkeit-Scintillationszähler (Beckmann LS-100) 10 min lang ausgezählt. Die Bestimmung der wahren Zerfallszahl pro Minute (ϕm) erfolgte mittels eines internen Standards. Es zeigte sich, daß unterschiedliche Pigmentkonzentrationen nur geringen Einfluß auf die Zählausbeute besitzen. Sie lag in allen Messungen zwischen 75% und 79%.

Angewandte Verfahren zur Reinigung markierter Pigmente



Abkürzungen: Acet. = Aceton; Ae = Diäthyläther; Äth. = Äthanol;
Benz. = Benzin; PAe = Petroläther; Isopr. = Isopropanol;
KG.-Pl. = Kieselgel-Platten; Cell.-Pl. = Cellulose-Platten

6.3. Fütterungsversuche mit ^{14}C -Aminolaevulinsäure, ^{14}C -Mevallonsäure und ^{14}C -Carbonat. Vergleich der spezif. Aktivitäten von Chlorophyll, Lutein und Astacin

Eine dünne Kultursuspension wurde in der logarithmischen Wachstumsphase mit $20\mu\text{Ci}/50\text{ml}$ ^{14}C -ALS bzw. ^{14}C -MVS inkubiert und nach Erreichen einer bestimmten Suspensionsdichte (8 - 10 Tage) vom radioaktiven Kulturmedium befreit und in N-freie Nährlösung überführt. Vor der Überführung wurde ein aliquot der Algensuspension extrahiert und auf Radioaktivitätseinbau in die Primärpigmente getestet (Dünnschicht-Scanner).

Überraschenderweise zeigte die Inkubation mit ^{14}C -MVS stets sehr ähnliche Markierungsspektren wie die Inkubation mit ^{14}C -ALS. Auch der Einbau von $^{14}\text{CO}_2$ ergab ein verwandtes Markierungsbild. In Abb. 33 sind die 3 Autoradiogramme der Primärpigmente im Original vergleichend gegenübergestellt.

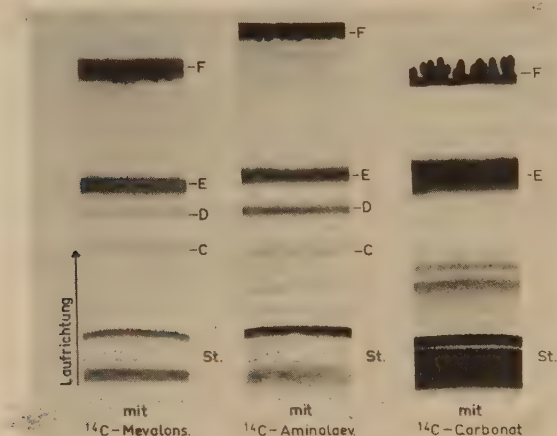


Abb. 33: Autoradiogramme der an Dünnschicht A getrennten Primärpigmente. 8 Tage Inkubation mit $20\mu\text{Ci}/50\text{ml}$ ^{14}C -MVS. 3 Tage Inkubation mit $30\mu\text{Ci}/50\text{ml}$ $^{14}\text{CO}_2$

Alle 3 Radiogramme zeigen eine starke Markierung an der Front, wo die Hauptmenge der farblosen Lipide läuft, ferner eine deutliche Markierung des Chlorophylls a (im $^{14}\text{CO}_2$ -Radiogramm mit einer Fremdaktivität verschmolzen) und eine Restaktivität im Startbereich.

^{14}C -ALS ergibt zwar die spezifisch beste Markierung des Chlorophylls (Zone D und E), doch wandert ein erheblicher Teil der Radioaktivität in die farblosen Lipide (F), ein kleiner Teil sogar in die Carotinoide (Zone C = Lutein + Zeax.). Sehr wahrscheinlich wird ein Teil der aufgenommenen ^{14}C -ALS unter Deaminierung, über die α -Ketoglutarsäure in den Tricarbonsäurecyclus eingeschleust und gelangt somit in Fette und Carotinoide.

Bei der Fütterung mit ^{14}C -MVS tritt die höchste Aktivität wiederum im Chlorophyll auf und zwar betont im Chlorophyll a, wogegen das Chlorophyll b nur sehr schwach markiert ist. Der Einbau in die Carotinoide ist trotz der langen Inkubationszeit sehr gering (schwache Markierung der Zone C). Diese Tatsache erschwert das Studium der Xanthophyllbiosynthese mit Hilfe radioaktiver Isotopen erheblich.

Bei kürzerer Inkubationszeit mit relativ hohen Aktivitäten an $^{14}\text{CO}_2$ ist wiederum das Chlorophyll a nur stark markiert. Die nähere Untersuchung des markierten Chlorophylls a ergab dabei, daß nach Verfütterung von $^{14}\text{CO}_2$ das Phytol um das 6,5-fache stärker markiert ist als der Porphyrinring.

Die Markierungsexperimente mit verschiedenen Isotopenverbindungen wie ^{14}C -ALS, ^{14}C -MVS und $^{14}\text{CO}_2$ führen also zu wenig differenzierten Markierungsbildern der Pigmente. Dasselbe gilt auch für die Radiogramme der aufgetrennten Pigmente von N-Mangelkulturen, welche mit obigen ^{14}C -Verbindungen vorinkubiert wurden. Aus den abgebildeten Dünnschicht-Scanner-Radiogrammen (Abb. 34) ist zu ersehen, daß sich unter N-Mangel die Hauptmenge der Radioaktivität an der Front häuft. Sie ist vornehmlich den farblosen Lipiden zuzuschreiben. Zur quantitativen Radioaktivitätsbestimmung des Astacins wurde daher der Astacinester P_3 nicht herangezogen, wohl aber bei der Berech-

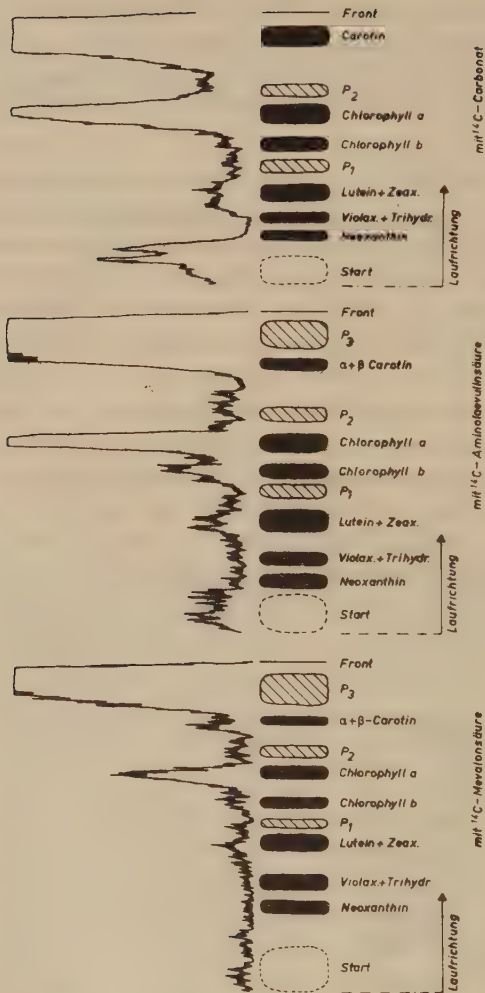


Abb. 34: Dünnenschicht-Scanner-Radiogramm der Pigmente von N-Mangelkulturen.
 Unten: 8 Tage Inkub. mit C-14-MVS ($20\mu\text{Ci}/50\text{ml}$) in N-haltigem Med., dann 8 Tg. in N-freiem Med.
 Mitte: 8 Tg. Inkub. mit C-14-ALS ($20\mu\text{Ci}/50\text{ml}$) in N-haltigem Med., dann 8 Tg. in N-freiem Med.
 Oben: 3 Tg. Inkub. mit $^{14}\text{CO}_2$ ($30\mu\text{Ci}/50\text{ml}$) in N-haltigem Med., dann 4 Tg. in N-freiem Med.

nung der spezifischen Aktivität berücksichtigt. Obgleich für die Astacinester P_1 und P_2 im Scintillationszähler gut meßbare Mengen an Aktivität ermittelt werden konnten, zeigen diese Zonen auf dem Scanner-Radiogramm keinen Gipfel. Dies beruht darauf, daß ihre Mengen nur 1/80 - 1/100 des Chlorophylls betragen, welches auf allen 3 Radiogrammen einen ausgeprägten Gipfel zeigt.

Zur quantitativen Untersuchung der Frage der Astacinbildung aus Chlorophyllabbauprodukten wurden während der Kultivierung in N-freiem Medium die spezifischen Aktivitäten (dpm/ μ Mol) von Chlorophyll und Astacin zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und miteinander verglichen. In nachstehender Tabelle sind diese zusammen mit einem Carotinoid, das die geringsten Mengenänderungen aufweist (Lutein) zusammengestellt. Die Werte stammen aus einem ausgewählten Markierungsversuch mit ^{14}C -ALS bzw. mit $^{14}\text{CO}_2$.

	Spezif. Aktivität dpm/ μ Mol.		
	Chlorophyll	Lutein	Astacin
mit ^{14}C -Aminolaev. vor Überföhr. in N-fr. Med.	1.325.336	684.258	-
ohne ^{14}C -Aminolaev., 8 Tage in N-fr. Med.	1.123.681	326.810	1.985.969
ohne ^{14}C -Aminolaev., 15 Tage in N-fr. Med.	343.389	121.094	1.112.030
mit ^{14}C -Carbonat nach 54 Std. in N-fr. Med.	11.521.576	418.717	2.589.063
mit ^{14}C -Carbonat nach 4 Tg. in N-fr. Med.	300.800	198.800	3.556.496

Das Markierungsverfahren mit ^{14}C -ALS wurde ähnlich wie in Abb. 34 beschrieben: 8 Tage Inkubation mit ^{14}C -ALS ($20\mu\text{Ci}/50\text{ml}$) in N-haltigem Medium, dann Überföhrung in N-freies Medium ohne

^{14}C -ALS. Unmittelbar vor der Überführung in N-freies Medium und nach 8 Tagen bzw. 15 Tagen Kultivierung in N-freiem Medium wurde jeweils eine Probe zur Bestimmung der spezif. Aktivitäten extrahiert. Zunächst fällt auf, daß die spezif. Aktivität des Chlorophylls unter N-Mangel abnimmt. Da aber unter N-Mangel das Chlorophyll auch in seiner Menge stark abnimmt, kann eine Ausdünnung der Radioaktivität durch Chlorophyll-Neusynthese kaum in Frage kommen. Man muß daher annehmen, daß in den Chloroplasten kein homogener durchmischter Chlorophyllpool mit einem einheitlichen turn over vorliegt. Aus dem Abfall der spezif. Radioaktivität muß man schließen, daß das in Gegenwart von ^{14}C -ALS zuletzt synthetisierte und daher stark markierte Chlorophyll nach Überführung in N-freies Medium auch zuerst wieder abgebaut wird. Dabei steigt der relative Anteil des nur schwach markierten Chlorophylls (das eigentlich photosynthetisch aktive?) mit langsamerem turn over allmählich wieder an, was die Abnahme der spezif. Aktivität zur Folge hat. Besonders auffällig äußert sich dieser Abfall der spezif. Aktivität des Chlorophylls im Markierungsversuch mit $^{14}\text{CO}_2$ (unterer Tabellenteil). Da also offensichtlich verschiedene Chlorophyll-pools mit unterschiedlichen Auf- und Abbaugeschwindigkeiten vorliegen, wird die Untersuchung des erwähnten Problems erschwert. Die Aktivitätsabnahme des Luteins dürfte dagegen auf der fortlaufenden Neusynthese dieses Pigments beruhen, da die Carotinoidbiosynthese durch N-Mangel nicht direkt betroffen ist.

Nimmt man wie CZYGAN (1967) an, Astacin würde direkt aus Chlorophyll entstehen, so müßte 1 Mol Chlorophyll (4 Isopreneinheiten aus dem Porphyrinring, 4 Isopreneinheiten aus dem Phytol) in 1 Mol Astacin umgebaut werden. Dabei wäre allerdings vorauszusetzen, daß der gesamte Chlorophyll-pool gleichmäßig markiert ist. Aus dem Vergleich der Impulszahlen des Chlorophylls und des Astacins ist zu entnehmen, daß die spez. Aktivitäten recht unterschiedlich sind. Da ^{14}C -ALS das Chlorophyll keineswegs ~~spez.~~ markiert, sondern auch stark in die farblosen Lipide streut, ist eher anzunehmen, daß die relativ

hohe Aktivität des Astacins auf den Einbau markierter C-Körper aus der ^{14}C -ALS zurückzuführen ist. In einem solchen Falle sollte man daher einen besonders guten ^{14}C -Einbau in das Astacin messen können (wogegen das Chlorophyll nur schwach markiert sein dürfte), wenn die Algen während des N-Mangelzustandes mit relativ hohen Aktivitäten an $^{14}\text{CO}_2$ gefüttert würden.

Stimuliert man obendrein den Prozeß des Chlorophyllabbaus und der Astacinbildung durch Zugabe von Gibberellinsäure, wie dies in diesem Versuch geschehen ist, so sollten die erwarteten Markierungsunterschiede noch klarer zum Vorschein kommen.

Eine Kultursuspension mittlerer Dichte wurde in N-freies Medium überführt und gleichzeitig mit $30\mu\text{Ci}/50\text{ml}$ $^{14}\text{CO}_2$ und $2 \cdot 10^{-3}\text{M}$ Gibberellinsäure versetzt. Bereits nach 54 Std. enthielt die N-Mangelkultur meßbare Mengen an Astacin. Die Ermittlung der spezif. Aktivitäten ergab jedoch beim Chlorophyll einen um das 4,5-fache höheren Wert, als beim Astacin (s. Tabelle, S. 91). Die Chlorophyllsynthese wird also zu Beginn des N-Mangelzustandes noch keineswegs eingestellt, sondern dauert offenbar für eine gewisse Zeit noch an. Die Markierung des Chlorophylls erfolgt dabei wesentlich schneller, als die des Astacins. Schon nach 96 Std. (4 Tg.) ist das Verhältnis aber umgekehrt. Jetzt hat das Astacin eine um das 11,8-fache höhere spezif. Aktivität als das Chlorophyll. Man muß also annehmen, daß das zuletzt synthetisierte und daher stark markierte Chlorophyll unter dem Einfluß der Gibberellinsäure sofort wieder abgebaut wurde. Das verbleibende restliche Chlorophyll muß im wesentlichen bereits vor der $^{14}\text{CO}_2$ -Zugabe gebildet worden sein und ist daher nur schwach markiert. Das Astacin weist dagegen einen Anstieg der spez. Aktivität auf, da offenbar in zunehmendem Maße radioaktives Acetat zur Biosynthese herangezogen wird.

Auf Grund der anzunehmenden wechselnden Geschwindigkeiten des Auf- und Abbaues der Pigmentmoleküle und der unvollkommenen Markierung des Chlorophyll-pool ist aus den spez. Aktivitäten des Chlorophylls und des Astacins keine bindende Aussage über die gegenseitige Umwandlung zu erwarten. Aus der ausgegli-

chenen Kontinuität der spez. Aktivität des Astacins, welches von den starken Aktivitätsschwankungen des Chlorophylls völlig unbeeinflusst bleibt, könnte man aber den Schluß ziehen, daß die Biosynthese des Astacins de novo erfolgt.

7. Zusammenfassung

1. Die Förderung der Astacinbildung durch Gibberellinsäure und die Verzögerung durch Kinetin lassen schließen, daß die SC-Biogenese mit Alterungsvorgängen in der Zelle im Zusammenhang steht.
2. Da die alterungsbeschleunigende Wirkung der Gibberellinsäure auf einer Aktivitätssteigerung lysosomaler Enzyme beruht, kann man annehmen, daß die verstärkte Astacinbildung eine Folge dieser lysosomalen Prozesse (Thylakoidauflösung) ist.
3. Es konnten keine chlorophyllfreien Mutanten isoliert werden, welche nach Überführung in N-freies Medium in gleicher Weise Astacin bilden wie der Wildstamm. Die untersuchten chlorophyllarmen Mutanten wiesen entweder schon in N-haltigem Medium Astacin auf oder hatten die Fähigkeit zur Astacinbildung ganz verloren. Die Frage, ob die SC aus Chlorophyllabbauprodukten entstehen, konnte daher mit Hilfe der untersuchten Mutanten nicht geklärt werden.
4. Die Zahl der Astacinester ist in den Mutanten verschieden vom Wildstamm. Die grün-braune Mutante weist bereits in N-haltigem Medium Astacin auf. In N-freiem Medium treten 3 zusätzliche Ester auf.
5. Die Anwendung von sog. "Hemmstoffen der Carotinoidsynthese" ist für das Studium der SC-Biogenese nicht geeignet. Ihre Hemmwirkungen beruhen auf verschiedenen Sekundäreffekten.
6. Isotopenversuche mit ^{14}C -MVS, ^{14}C -ALS und $^{14}\text{CO}_2$ erbrachten keine Hinweise für eine Verwendung von Chlorophyllabbauprodukten als Bausteine des Astacins. Es wird daher die

Auffassung vertreten, daß die Biogenese der SC auf dem normalen Biosyntheseweg der Carotinoide erfolgt.

7. Trihydroxy- α -carotin wird aufgrund seiner gegenläufigen Korrelation in den Mengenänderungen mit Astacin als mögliche Vorstufe des Astacins diskutiert.

IV. ABSCHLIESSENDE DISKUSSION

Die Auslösung der Sekundärkarotinoidbildung durch N-Mangel in Algen ist als ein komplexes entwicklungsphysiologisches Problem anzusehen. N-Mangel bewirkt eine Reihe ganz verschiedener Erscheinungen, wie z.B. Verminderung der Wachstumsgeschwindigkeit, verstärkte Lipidbildung, Abbau der Primärpigmente, Einschmelzung der Thylakoide u.a. Dies läßt erwarten, daß die SC-Bildung das Ergebnis des Zusammenspiels verschiedener Faktoren darstellt. Die Klärung des Kausalzusammenhangs zwischen N-Mangel und SC-Bildung war das Ziel dieser Arbeit.

Als überraschend erwies sich die Feststellung, daß zur SC-Bildung außer N-Mangel das Vorhandensein metabolisierbarer Kohlenhydrate (KH) notwendig ist. In belichteten Kulturen werden diese KH durch die Photosynthese bereitgestellt; in N-freien Dunkelkulturen müssen sie z.B. in Form von Glukose zur Verfügung gestellt werden, damit die SC entstehen können. Ist in N-freien Lichtkulturen die Photosynthese gehemmt (z.B. durch DCMU) oder in glukosehaltigen N-freien Dunkelkulturen der Zuckerabbau, so unterbleibt in beiden Fällen die Astacinbildung. Unter diesen Bedingungen findet aber auch kein Abbau der Primärpigmente statt; die Kulturen bleiben über lange Zeit unverändert grün. Dies bedeutet, daß in der Zelle ein Umsatz von Zuckern stattfinden muß, damit der N-Mangel in den beobachteten Erscheinungen wirksam wird (Effektorwirkung der KH). Ohne diesen Umsatz von Zuckern verharrt die Zelle in einer Art Ruhezustand, wobei nach außen hin keine auffälligen Veränderungen zu beobachten sind.

Bei Vorhandensein von Kohlenhydraten aber, benötigt die Zelle auch entsprechende Enzymproteine, welche zur Metabolisierung der angebotenen Zucker, für Vorbereitungen zu Zellteilungen oder andere essentielle Vorgänge erforderlich sind. Der zur Biosynthese dieser Proteine nötige Aminostickstoff kann aber mangels Stickstoff im Nährmedium - nicht mehr durch Reduktion von Nitrat zur Verfügung gestellt werden. Offensichtlich hilft

sich die Zelle nun dadurch, indem sie die funktionell weniger wichtigen Strukturproteine der Thylakoide hydrolysiert und die anfallenden Aminosäuren in den intermediären Protein-pool einschleust. Dies führt schließlich zu einer allgemeinen Auflösung des Chloroplasten, wobei gleichzeitig die Primärpigmente abgebaut werden.

Die Einschmelzung des Chloroplasten setzt aber voraus, daß Proteasen und andere, pigmentabbauende Enzyme, z.B. Chlorophyllasen, gebildet oder aktiviert werden. D.h., unter N-Mangel müssen bestimmte abbauende Enzyme, die vielleicht lysosomaler Herkunft sind, ihre Tätigkeit aufnehmen. Tatsächlich beobachteten HARRIS and KIRK (1969) und MIHARA et al. (1968) unter dem Einfluß eines hohen Kohlenhydratangebotes bei gleichzeitigem N-Mangel einen starken Aktivitätsanstieg der RNase und Protease. Nach den Untersuchungen von MIHARA sind die lysosomalen Prozesse zunächst ganz auf den Chloroplasten konzentriert, wogegen der cytoplasmatische Bereich vorerst verschont bleibt. Auch während des Alterns oder in welkenden Pflanzenorganen wurde das Auftreten lysosomaler Enzyme festgestellt (MATILE 1969). CHICHESTER et al. (1965) haben eine solche Aktivierung pigmentab- und umbauender Enzyme (Chlorophyllasen, Epoxidasen, Hydroxylasen, Lipoxidasen, chlorophyll- und carotinoidabbauende oxydative Enzyme) in alterndem Pflanzenmaterial ebenfalls beobachtet.

Es liegt somit der Schluß nahe, daß die Regulation der lysosomalen Enzyme eine Schlüsselstellung in der Kausalkette Stickstoffmangel-Sekundär-carotinoidbildung einnimmt. Dabei wäre es denkbar, daß durch die Verkleinerung des intermediären Protein-pool die lysosomalen Enzyme induziert oder aktiviert werden (Abb. 34). Zu einer solchen Verkleinerung des Protein-pool kommt es normalerweise unter N-Mangel, wenn genügend Kohlenhydrate zur Verfügung stehen. Aber auch bei Anwesenheit von Nitratstickstoff kann sich dieser pool z.T. verkleinern, wenn die Neusynthese von Proteinen durch Hemmstoffe unterbunden wird. Eine dritte Möglichkeit ist gegeben, wenn die Stickstoffassimilation durch Absenkung des p_H -Wertes in der Nähr-

lösung blockiert wird.

Ist dagegen die Bildung oder Aktivierung der lysosomalen Enzyme in irgendeiner Weise gestört, so erfolgt in keinem Falle ein Abbau der Primärpigmente und eine Bildung von Astacin. Dies trifft offensichtlich für diejenigen Mutanten zu, welche unter N-Mangel im Licht kein Astacin bilden und fortwährend grün bleiben.

Eine Steigerung der lysosomalen Enzymaktivität, z.B. durch ein hohes Zuckerangebot oder durch Zugabe von Gibberellinsäure (COHEN et al. 1969; HESS 1968) führt dagegen zu einer deutlichen Beschleunigung des Pigmentabbaus und der Astacinbildung.

Die Veränderungen in der Pigmentgarnitur, die während der enzymatischen Thylakoidauflösung stattfinden, könnten in folgender Weise ablaufen: Das "freigelegte" Chlorophyll erfährt eine starke Abnahme, da mangels N-haltiger Vorstufen bzw. wegen Auflösung der Thylakoidstrukturen die Neusynthese eingestellt ist und der abbauende Prozeß vorherrscht. Aber auch die Primärcarotinoide zeigen eine Abnahme, da ein Teil von ihnen wahrscheinlich nach Art einer β -Oxydation (BLAIN 1963) abgebaut wird und ein anderer Teil möglicherweise über eine geeignete Vorstufe (Trihydroxy- α -carotin?) in Astacin transformiert wird. Diese Umwandlung könnte unter der katalytischen Mitwirkung einer Oxygenase erfolgen. Da unter N-Mangel solche oxydativen Prozesse allgemein stark vorherrschen, so werden die noch nachsynthetisierten Carotinoide ebenfalls sofort zu Astacin oxygeniert.

Neben dem im Zuge der voranschreitenden Thylakoideinschmelzung anfallenden Astacin treten gleichzeitig in verstärktem Maße freie Fettsäuren auf, welche teils aus dem gesteigerten KH-Stoffwechsel, teils aus der Hydrolyse von Strukturlipiden hervorgehen. Die Hydroxylgruppen des Astacins können damit sehr leicht verestert werden. Der dabei entstehende Farbstoffester ist stark lipophil und wird zusammen mit anderem Lipidmaterial in den osmiophilen Globuli kompartmentiert. In

stand noch eine gewisse Reststruktur des Lamellarsystems erhalten bleibt. Ankistrodesmus kann offenbar auf diese Weise in der freien Natur Zeiten unzureichender N-Versorgung überdauern. Die während dieser Zeit akkumulierten SC und Lipide gewinnen somit den Charakter von Reservestoffen, welche bei ausreichender N-Zufuhr wieder mobilisiert werden können. Abschließend sei noch darauf hingewiesen, daß die Fähigkeit einzelner Grünalgen zur SC-Bildung auch für die taxonomische Auswertung von Bedeutung ist. Einschlägige chemotaxonomische Untersuchungen, welche das Merkmal "Sekundärcarotinoidbildung" berücksichtigen, wurden bereits bei den Gattungen Chlorella, Ankistrodesmus und Scenedesmus von KESSLER (1963) und KESSLER und CZYGAN (1966, 1967) durchgeführt.

V. ABSCHLIESSENDE ZUSAMMENFASSUNG

1. Nach Überführung grüner Ankistrodesmuskulturen in N-freies Nährmedium erfolgt ein allmählicher Abbau der Chlorophylle und Primäracarotinoide, wobei gleichzeitig ein orange-rotes Sekundäracarotinoid, Astacin, neu gebildet wird.
2. Astacin ist als einziges Xanthophyll verestert und erscheint im Verteilungschromatogramm in 3 Banden. Im Gegensatz zu allen übrigen Pigmenten sind die Astacinester außerhalb der Thylakoide lokalisiert und in osmiphilen Einschlüssen kompartimentiert.
3. Die Veränderung der Pigmentgarnitur durch N-Mangel ist uneingeschränkt reversibel. Nach Zugabe von Stickstoff zu orange-rot gefärbten N-Mangelkulturen erfolgt innerhalb relativ kurzer Zeit (65 Std.) eine vollständige Restitution der Primärpigmente ("Ergrünen") und ein Abbau der Astacinester.
4. In abgeschwächter Form ist ein Abbau der Primärpigmente und das Erscheinen von Astacin auch in N-haltigen Kulturen zu beobachten, wenn der pH-Wert des Nährmediums auf 5 - 3,5 abgesenkt wird.
5. Die Absenkung des pH-Wertes im Nährmedium führt zu einer Hemmung der Nitrataufnahme. Die Sekundäracarotinoidbildung in sauren N-haltigen Kulturen wird daher als eine Folge der blockierten Nitrataassimilation betrachtet und auf der Basis des N-Mangels diskutiert.
6. In N-haltigen Kulturen kann in beschränktem Umfang die Astacinbildung auch durch Hemmstoffe der Proteinsynthese (Actidion, 5-Fluoruracil, 8-Azaguanin, 6-Mercaptopurin) induziert werden. Damit ist erwiesen, daß die Blockierung des Stickstoff-Stoffwechsels an verschiedenen Stellen die Sekundäracarotinoidbildung veranlaßt.
7. Die ungestörte Funktion des Kohlenhydratstoffwechsels ist eine weitere Grundvoraussetzung für die Bildung von Sekun-

därcarotinoiden. Die Astacinbildung unterbleibt, wenn in N-freien Lichtkulturen die Photosynthese gehemmt wird (z.B. durch DCMU).

8. Die Astacinbildung ist lichtunabhängig und erfolgt auch im Dunkeln, sofern die Kulturen mit Glukose versorgt werden. Bei Entzug von Glukose oder bei blockierter Glukoseaufnahme (z.B. durch N_2 -Begasung) bleiben N-freie Dunkelkulturen normal grün; d.h. es erfolgt weder ein Abbau der Primärpigmente noch eine Bildung von Astacin.
9. Die Photosyntheseleistung gebleichter N-Mangelkulturen nimmt nicht in demselben Maße ab, wie es der Chlorophyllverlust vortäuscht. Die zunehmende Anhäufung von Astacin in chlorophyllarmen N-Mangelkulturen stützt sich somit auf eine noch anhaltende - wenn auch verminderte - Photosyntheseaktivität.
10. Die Bleichwirkung (Primärpigmentabbau) von assimilierbaren Zuckern (z.B. Glukose, Saccarose) in N-haltigen Lichtkulturen beruht auf einer stark beschleunigten Stickstoffverarmung in der Nährlösung. In N-freien Kulturen hat ein gesteigerter Kohlenhydratumsatz auch eine verstärkte Astacinbildung zur Folge (Stimulationswirkung von Glukose).
11. Die Astacinbildung erfolgt stets unter denselben Bedingungen, für welche durch elektronenmikroskopische Untersuchungen ein Abbau der Thylakoide beobachtet wurde (z.B. N-Mangel, hohe Glukosekonzentration in der Nährlösung). Für die Einschmelzung der Thylakoide ist die Tätigkeit lysosomaler Prozesse erforderlich. Die Astacinbildung wird durch Agenzien gefördert bzw. verzögert, welche nachweislich die lysosomalen Prozesse fördern (z.B. Gibberellinsäure) bzw. verzögern (z.B. Kinetin).
12. Pigmentmutanten erwiesen sich zum Studium der Astacinbiogenese als ungeeignet, da bei ihnen der für die Sekundärcarotinoidbildung erforderliche Prozeß des allmählichen Thylakoidabbaus stets in irgendeiner Weise gestört ist.

13. Stöchiometrische Vergleiche zwischen abgebautem Chlorophyll und neugebildetem Astacin und Isotopenversuche mit ^{14}C -markierter Mevalonsäure, Aminolaëvulinsäure und $^{14}\text{CO}_2$ erbrachten keine Hinweise für die Verwendung von Chlorophyllabbauprodukten als Bausteine des Astacins.
14. Es wird angenommen, daß die Bildung der Sekundärcarotinoide aus Acetateinheiten auf dem normalen Biosyntheseweg der Carotinoide erfolgt, wobei das Trihydroxycarotin (nach dem Strukturvorschlag von STRANSKY) wegen seiner auffälligen Mengenkorrelation als mögliche Vorstufe des Astacins diskutiert wird.
15. Die Sekundärcarotinoidbildung ist das Ergebnis eines multifaktoriell abhängigen und beeinflussbaren entwicklungsphysiologischen Prozesses. Der Wirkungszusammenhang von N-Mangel, KH-Stoffwechsel, Primärpigmentabbau und Sekundärcarotinoidbildung wurde in einem Schema zur Darstellung gebracht.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- AACH, H.G.: Über Abbau und Regeneration der Chloroplastenfarbstoffe bei *Chlorella*. Arch. Mikrobiol. 19, 166-173 (1953)
- AARONSON, S., B.B. ELLENBOGEN, L.K. YELLEN and S.H. HUTTNER: In vivo differentiation of *Euglena* cytoplasmatic and chloroplast protein synthesis with chloramphenicol and D, L-ethione. Biochem. biophys. Res. Commun. 27, 535-538 (1967)
- ACCADIA, F.D., O. GRIBANOVSKI-SASSU, A. ROMAGNOLI and L. TUTTOBELLO: Produktion of carotenoids by a green alga. Nature 208, 1342 (1965)
- AITZETMÜLLER, K., H.H. STRAIN, W.A. SVEC, M. GRANDOLFO and J.J. KATZ: Loroxanthin, a unique xanthophyll from *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. Phytochem. 8, 1761-1770 (1969)
- ANDKEENKO, S.S. and N.D. ALEKHINA: Nitrogen metabolism of plants under conditions of high acidity of the nutrient medium. Seliskokholz. Biol. 1, 549-558 (1966). Russ.-Ref. in: Chem. Abstr. (Biochem. Sect.) 66, 5880 (1967)
- AOKI, SH., M. MATSUKA, E. HASE: De- and regeneration of chloroplasts in the cells of *Chlorella protothecoides*. V. Degeneration of chloroplasts induced by different carbon sources and effects of some antimetabolites upon the process induced by glucose. Plant and Cell Physiol. 6, 487-497 (1965)
- BERGER, C. und A. PIRSON: Aktivitätsänderungen einiger Enzyme synchronisierter *Chlorella*-Zellen im Licht-Dunkel-Wechsel. II. Veränderungen bei gehemmtem Wachstum. Flora 158, 164-180 (1967)
- BIELAWSKI, I., T.E. THOMPSON and A.L. LEHNINGER: The effect of 2,4-dinitrophenol on the electrical resistance of phospholipid bilayer membranes. Biochem. biophys. Res. Commun. 24, 948-954 (1966)
- BLAIN, I.A.: The enzymatic destruction of carotene and carotenoids. In: Wiss. Veröffentl. dtsh. Ges. f. Ernährung. Ed. K. Lang, Steinkopff Verl., Darmstadt, Bd. 9, S. 378-387 (1963)
- BOTTRILL, D.E. and J.B. HANSON: The action of 2,4-dinitrophenol on corn root mitochondria. Austr. J. biol. Sci. 22, 847-855 (1969)
- BRÜGGEMANN, O.: Wirkungen des Stickstoffmangels bei einzelligen Grünalgen. Diss. am Bot. Inst. Univ. Marburg (1954)

- CHANTRENNE, H. and S. DEVREUX: Effects of 8-azaguanine on the synthesis of protein and nucleic acids in *Bacillus cereus*. *Nature* 181, 1737 (1958)
- CHICHESTER, C.O. and T.O.M. NAKAYAMA: Pigment changes in senescent and stored tissue. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Ed. T.W. Goodwin, Acad. Press London-N.Y. (1965)
- COHEN, B.S., Y. LESHEM and A. PINSKY: Gibberellin and protease activity in *Medicago sativa*. *Physiologia Plant.* 22, 37-42 (1969)
- CZYGAN, F.C.: Über die Wirkung von Chloramphenicol auf Wachstum und das Nitrat reduzierende Enzymsystem von Grünalgen. *Naturwiss.* 51, 244 (1964a)
- ders.: Untersuchungen über die Wirkung von Chloramphenicol auf den Auf- und Abbau der Pigmente einiger Grünalgen. *Arch. Mikrobiol.* 47, 251-259 (1964b)
- ders.: Biosynthese der Carotinoide. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 80, 627-644 (1967)
- ders.: Sekundär-Carotinoide in Grünalgen. I. Chemie, Vorkommen und Faktoren, welche die Bildung dieser Polyene beeinflussen. *Arch. Mikrobiol.* 61, 81-102 (1968a)
- ders.: Sekundär-Carotinoide in Grünalgen. II. Untersuchungen zur Biogenese. *Arch. Mikrobiol.* 62, 209-236 (1968b)
- DERSCH, G.: Mineralsalz-mangel und Sekundärcarotinoide in Grünalgen. *Flora* 149, 566-603 (1960)
- DORFMANN, R.I.: Inhibitors of steroid actions and cholesterol and steroid biosynthesis. In: *Metabolic Inhibitors*. Ed. Hochster and Quastel, Acad. Press New York-London (1963)
- DROOP, M.R.: Conditions governing Haematochrome formation and loss in the alga *Haematococcus pl. Flotow*. *Arch. Mikrobiol.* 20, 391-397 (1964)
- EGLE, K.: Chlorophyllabbau. In: *Encyclopedia of plant Physiol.* vol., V/1, p.354-386, Springer Verl., Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960
- ELLIS, R.I.: Chloroplast ribosomes: stereospecificity of inhibition by chloramphenicol. *Science* 163, 477-478 (1969)
- ders. and I.R. McDONALD: Activation of protein synthesis by microsomes from aging beet disks. *Plant Physiol.* 42, 1297-1302 (1967)
- FALK, H.: Rough thylakoids: polysomes attached to chloroplast membranes. *J. Cell Biology* 42, 582-587 (1969)

- FOLIN, O. and H. WU: Two revised copper methods for blood sugar determination. J. biol Chem. 82, 83-93 (1929)
- GOODENOUGH, U.W., I.I. ARMSTRONG and R.P. LEVINE: Photosynthetic properties of ac - 31, a mutant strain of Chlamydomonas reinhardtii devoid of chloroplast membrane stacking. Plant Physiol 44, 1001-1012 (1969)
- GOODWIN, T.W.: The biochemistry of locusts. II. Carotinoid distribution in solitary and gregarious phases of the african migratory locust and the desert locust. Biochem. J. 45, 472-479 (1949)
- ders.: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. Acad. Press. London-New York 1965
- GROLLMANN, A.P.: Structural basis of inhibition of protein synthesis by emetine and cycloheximide based on an analogy between ipecac alkaloids and glutarimide antibiotics. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 56, 1867 (1966)
- HAGER, A.: Die Zusammenhänge zwischen lichtinduzierten Xanthophyll-Umwandlungen und Hill-Reaktion. Ber. dtsh. bot. Ges. 79, 94-106 (1966)
- ders.: Untersuchungen über die lichtinduzierten reversiblen Xanthophyllumwandlungen an Chlorella und Spinacia. Planta 74, 148-172 (1966)
- ders. und T. MEYER-BERTENRATH: Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle von Blättern, Algen isolierten Chloroplasten mit Hilfe dünn-schichtchromatographischer Methoden. Planta 69, 198-217 (1966)
- ders.: Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin-Zeaxanthin-Umwandlung; Beziehungen zur Photophosphorylierung, Planta 89, 224-243 (1969)
- HARDING, R.W. and H.K. MITCHELL: The effect of cycloheximide on carotenoid biosynthesis in Neurospora crassa. Arch. Biochem. Biophys. 128, 814-818 (1968)
- HARRIS, R.C. and I.T.O. KIRK: Control of chloroplast formation in Euglena gracilis. - Antagonism between carbon and nitrogen sources. Biochem. J. 113, 195-206 (1969)
- HARRIS, W.M. and A.R. SPURR: Chromoplasts of tomato fruits. - I. Ultrastructure of low pigment and high - beta mutants. Carotenes analyses. Am. J. Bot. 56, 369-379 (1969)
- HESS, D.: Biochemische Genetik, Springer Verl., Berlin-Heidelberg-N.Y. 1968, S. 275-283

- HOCHSTER, R.M. and QUASTEL: Metabolic Inhibitors. Acad. Press New York-London 1963
- HÖFNER, W.: Chloramphenicol-Einfluß auf die C-14-Aufnahme isolierter Gerstenwurzeln aus Natrium-C-14-hydrogencarbonat. Naturwiss. 50, 720 (1963)
- HOPFER, U., A.L. LEHNINGER and T.E. THOMPSON: Protonic conductance across phospholipid bilayer membranes induced by uncoupling agents for oxidative phosphorylation. Proc. nat. Acad. Sci. 59 484-490 (1968)
- HOROWITZ, I., I.I. SAUKONEN and E. CHARGAFF: Effects of fluoropyrimidines on the synthesis of bacterial proteins and nucleic acids. J. biol. Chem. 235, 3266-3272 (1960)
- HOROVITZ, C.T., I. BRAD, I. ENESCU, S. NICULESCU and E. JOKL: Biochemische Differenzierungen bei Mais unter Mineralstoffmangel. Physiologia Plant. 21, 1332-1340 (1968)
- ISHIKAWA, S.I. and E. HASE: Nutritional control of cell pigmentation in *Chlorella prothecoides* with special reference to the degeneration of chloroplast induced by glucose. Plant and Cell Physiol. 5, 27-240 (1964)
- KANDLER, O. und W. TANNER: Die Photoassimilation von Glukose als Indikator für die Lichtphosphorylierung in vivo. Ber. dtsh. bot. Ges. 79, 48-57 (1966)
- KARRER, P. und E. JUCKER: Carotinoide. Birkhäuser Verlag, Basel 1948, S. 243-244
- KESSLER, E.: Bildung von Sekundärcarotinoiden bei N-Mangel und Hydrogenase-Aktivität als taxonomische Merkmale in der Gattung *Chlorella*. In: Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria. Tokyo 1963, S. 7-20
- ders. und F.C. CZYGAN: *Chlorella zofingiensis* Dönn: Isolierung neuer Stämme und ihre physiologischen und biochemischen Eigenschaften. Ber. dtsh. bot. Ges. 78, 342-347 (1965)
- ders. und F.C. CZYGAN: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattung *Chlorella*. Arch. Mikrobiol. 54, 37-45 (1966)
- ders. und F.C. CZYGAN: Physiologische und biochemische Beiträge zur Taxonomie der Gattungen *Ankistrodesmus* und *Scenedesmus*. I. Hydrogenase, Sekundärcarotinoide und Gelatine-Verflüssigung. Arch. Mikrobiol. 55, 320-326 (1967)
- KEY, I.L.: Effect of purine and pyrimidine analogues on growth and RNA-metabolism in the Soybean hypocotyl. The selective action of 5-fluorouracil. Plant. Physiol. 41, 1257-1264 (1966)

- KIRK, I.T.O. and R.L. ALLEN: Dependence of Chloroplast pigment synthesis on protein synthesis: effect of actidione. Biochem. biophys. Res. Commun. 21, 523-530 (1965)
- KLEINIG, H.: Sekundäracarotinoide in der Grünalge Sphaeroplea. Z. Naturforsch. 22b, 977-979 (1969)
- ders. und H. EGGER: Ketocarotinoidester in Acetabularia mediterranea Lam. - Phytochem. 6, 611-619 (1967)
- ders. und M. WRISCHER: Die Feinstruktur von Acetabularia-Chloroplasten bei Sekundäracarotinoidbildung. Z. Pflanzenphysiol. 58, 248-251 (1968)
- KLJATSCHKO-GURVITSCH, G.L.: Directed biosynthesis of carbohydrates in Chlorella. Fiziol. Rastenij 11, 978-987 (1964) in: Ber. wiss. Biol. 297 (Ref.) 73-74 (1968)
- deKLOET, S.R. and P.J. STRIJKERT: Selective inhibition of ribosomal RNA synthesis in Saccharomyces carlsberg. by 5-fluoruracil. Biochem. biophys. Res. Commun. 23, 49-55 (1966)
- KROGMANN, D.W., A.T. JAGENDORF and M. AVRON: Uncouplers of Spinach Chloroplast photosynthetic phosphorylation. Plant Physiol. 34, 272-277 (1959)
- KUHN, R., J. STENE und SÖRENSEN: Über die Verbreitung des Astaxanthins im Tier- und Pflanzenreich. Ber. dtsch. chem. Ges. 72, 1688-1701 (1939)
- LICHTENTHALER, H.K.: Die Verbreitung der lipophilen Plastidenchinone in nicht-grünen Pflanzengeweben. Z. Pflanzenphysiol. 59, 195-210 (1968)
- ders. und B. SPREY: Über die osmiophilen globulären Lipideinschlüsse der Chloroplasten. Z. Naturforsch. 21b, 690-697 (1966)
- LOSADA, M. and D.J. ARNON: Selective inhibitors of photosynthesis. In: Metabolic Inhibitors, vol. II. Ed. Hochster and Quastel, Acad. Press. N.Y. and Lond. 1963, p.p.559-593
- LJUBEŠIĆ, N.: Feinbau der Chloroplasten während der Vergilbung und Wiederergrünung der Blätter. Protoplasma 66, 369-379 (1968)
- MALOTOVSKY, Y.G. and A.M. SMIRNOV: On the effect of CAP on protein synthesis in plants. Ref. in: Ber. wiss. Biol. 210, 80 (1964)
- MARGULIES, M.M.: Effect of chloramphenicol on light dependent synthesis of proteins and enzymes of leaves and chloroplasts of Phaseolus vulgaris. Plant Physiol. 39, 579-585 (1964)

- MATILE, P.: Vacuoles as lysosomes of plant cells. *Biochem. J.* 111, 26 P (1969)
- MAYER, F.: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Grünalge *Ankistrodesmus braunii* mit Hilfe der Gefüertechnik. *J. Ultrastruct. Res.* 28, 102-111 (1969)
- ders. und F.C. CZYGAN: Änderungen der Ultrastrukturen in den Grünalgen *Ankistrodesmus braunii* und *Chlorella fusca* var. *rubescens* bei Stickstoffmangel. *Planta* 86, 175-185 (1969)
- McLEAN, R.: Primary and secondary carotenoids of *Spongiochloris typica*. *Physiologia Plant.* 20, 41-47 (1967)
- MIHARA, S., KIMURA, K., and E. HASE: Studies on ribonucleic acids from *Chlorella prothecoides* with special reference to the degradation of chloroplast RNA during the process of "glucose-bleaching". *Plant and Cell Physiol.* 9, 87-102 (1968)
- MITCHELL, P.: Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148 (1961)
- MORRIS, J.: Inhibition of protein synthesis by cycloheximide in *Chlorella*. *Nature* 211, 1190-1192 (1966a)
- ders. Some effects of chloramphenicol on the metabolism of *Chlorella*. *Arch. Mikrobiol.* 54, 160-176 (1966b)
- ders. The effects of cycloheximide on protein and nucleic acid synthesis by *Chlorella*. *J. Exptl. Bot.* 18, 54-64 (1967)
- MÜLLER, G.O.: *Praktikum der quantitativen chemischen Analyse*. Hirzel Verlag Leipzig 1957
- NEUMANN, H. and A.T. JAGENDORF: Dinitrophenol as an uncoupler of photosynthetic phosphorylation. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 16, 562-567 (1964)
- OHAD, J., P. SICKEVITZ and G.E. PALADE: Biogenesis of chloroplast membranes. II. Plastid differentiation during greening of a dark-grown algal mutant (*Chlamydomonas reinhardi*). *J. Cell. Biol.* 35, 553-584 (1968)
- PIRSON, A., C. TICHY and G. WILHELMI: Stoffwechsel und Mineral-salzernährung einzelliger Grünalgen. I. Vergleichende Untersuchungen an Mangelkulturen von *Ankistrodesmus braunii*. *Planta* 40, 199-253 (1952)
- POGO, B.G.T. and A.O. POGO: Inhibition by chloramphenicol of chlorophyll and protein synthesis and growth in *Euglena gracilis*. *J. Protozool.* 12, 96-100 (1965)

- PRATT, R.: Studies on *Chlorella vulgaris*. V. Some properties of the growth inhibitor formed by *Chlorella* cells. *Amer. J. Bot.* 29, 142 (1942)
- RANNEBERG, H. und C.G. ARNOLD: Die Wirkung von Äthylmethansulfonat auf *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and gen. Genetics* 101, 212-216 (1968)
- REYES, P., C.O. CHICHESTER and T.O.M. NAKAYAMA: The mechanism of β -ionone stimulation of carotenoid and ergosterol biosynthesis in *Phycomyces blakesleeanus*. *Biochem. biophys. Acta* 90, 578-592 (1964)
- RÖBBELEN, G.: Gestörte Thylakoidbildung in Chloroplasten einer *Xantha*-Mutante von *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 69, 1-26 (1966)
- ROUX, S.J. and J.T. McHALE: Ultrastructural changes during the senescence of detached tomato leaves. *Phyton* 25, 113-122 (1968)
- SAUTER, I.I.: Cytochemischer Nachweis von Redoxfermenten in Fettropfenassoziierten "Sphärosomen". *Naturwiss.* 55, 351 (1968)
- SCHANTZ, R.H. DURANTON et M. PEYRIÈRE: Influence du glucose sur la synthèse de la chlorophylle et des caroténoïdes dans les tissus de *Topinambour* cultivés in vitro. *Acad. Sci. (Paris) Ser. D.* 265, 205-298 (1967)
- SCHWEET, R. and R. HEINTZ: Protein synthesis. *Annual Rev. Biochem.* 35, II., 723-758 (1966)
- SESTAK, Z. and M. BASLERROVA: Changes in chlorophylls and carotenoids in ageing cultures of green algae as studied by paper chromatography. In: *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*. Tokyo 1963, S.423-429
- SHAH, S.P., L.J. ROGERS and T.W. GOODWIN: Inhibitor studies on a proposed route of acetyl-coenzyme A synthesis in chloroplasts. *Proc. Bioch. Soc.* 17P-18P, In: *Biochem. J.* 108, (1968)
- STRANSKY, H.: Carotinoidmuster und lichtinduzierte Xanthophyllumwandlungen bei verschiedenen Algenklassen. *Diss. am Bot. Inst. d. Univ. München* 1969, S.87-90
- SZALAI, I.: Gibberellinsäure und Chlorophyllgehalt des Blattes von *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 83, 161-165 (1968)
- ders. Relation between the chlorophyll content and paleness of gibberellic acid-treated leaves. *Physiologia Plantarum* 22, 587-593 (1969)
- TAKASHIMA, K., I.S. ISHIKAWA and E. HASE: Further notes on the growth and chlorophyll formation of *Chlorella* proth. *Plant. Cell Physiol.* 5, 321-332 (1964)

- TANNER, W., M. LÖFFLER and O. KANDLER: Cyclic photophosphorylation in vivo and its relation to photosynthetic CO₂-fixation. *Plant Physiol* 44, 422-428 (1969)
- TAYLOR, F.J.: Chloramphenicol inhibition of the growth of green algae. *Nature* 207, 783 (1965)
- THOMAS, D.M., R.C. HARRIS, J.T.O. KIRR and T.W. GODDWIN: The mode of action of trisporic acid. Studies on carotenogenesis in *Blakeslea trispora*. *Phytochemistry* 6, 361-366 (1967)
- THOMAS, J.B.: Einführung in die Photobiologie. Thieme Verlag Stuttgart 1968
- TISCHER, I.: Über das Euglenarhodon und andere Carotinoide einer roten Euglene. Hoppe-Seyler's Ztschr. f. Physiol. Chem. 239, 257-269 (1936)
- ders. Über die Identität von "Euglenarhodon" mit Astacin, Hoppe Seyler's Ztschr. f. Physiol. Chem. 267, 281-284 (1941)
- ders. Über die Carotinoide von *Hämatococcus pluvialis*. Hoppe Seyler's Ztschr. f. Physiol. Chem. 281, 143-155 (1944)
- TREBST, A.: Zur Hemmung photosynthetischer Reaktionen in isolierten Chloroplasten durch Salicylaldoxim. *Z. Naturforsch.* 18b, 817-821 (1963)
- TREHARNE, K.J., MERCER, E.J. and GOODWIN, T.W.: Incorporation of ¹⁴C-carbon dioxide and 2-¹⁴C-mevalonic acid into terpenoids of higher plants during chloroplast development. *Biochem. J.* 99, 239-245 (1966)
- UDVARDY, J., G.L. FARKAS and E. MARRE: On RNase and other hydrolytic enzymes in excised *Avena* leaf tissues. *Plant and Cell Physiol.* 10, 375-386 (1969)
- VIALA, G. Astaxanthin in *Chlamydomonas nivalis*. *Acad. Sci. (Paris)*, Ser. D 263, 1383-1386 (1966). Ref. in: *Chem. Abstr.* 66, 53197 (1967)
- WALLES, B.: Plastid structures of carotenoid-deficient mutants of sunflower. II. The yellow mutant. *Hereditas* 56, 131-136 (1966)
- WHATLEY, F.R., B.M. ALLEN and D.J. ARNON: Photosynthesis by isolated chloroplasts. VII. Vitamin K and riboflavin phosphate as cofactors of cyclic photophosphorylation. *Biochem. biophys. Acta* 32, 32-46 (1959)
- WIECKOWSKI, S. and T.W. GOODWIN: Incorporation of DL-2-¹⁴C-mevalonic acid lactone into β-carotene and the phytol side chain of chlorophyll in cotyledons of four species of pine seedlings. *Biochem. J.* 105, 89-92 (1967)

- WILD, A. und K. EGLE: Die Größe der photosynthetischen Einheit und ihre Variabilität. IV. Die Beziehung der CO_2 -Fixierung zum Chlorophyllgehalt bei einer mutierten *Chlorella*. *Photosynthetica* 2, 253-260 (1968)
- ders. und K. EGLE: Die Größe der photosynthetischen Einheit und ihre Variabilität. III. Eine Erklärung für die hohe Photosyntheseleistung chlorophyllarmer Mutanten. *Biol. Zentralbl.* 88, 137-145 (1969)
- WILLSTÄTTER, R. und A. STOLL: Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure. Springer Verlag Berlin 1918

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Professor Dr. A. Hager angefertigt. Für die Überlassung des Themas, das rege Interesse am Fortgang der Arbeit und die vielen wissenschaftlichen und praktischen Ratschläge schulde ich ihm besonderen Dank.

Herrn Professor Dr. H. Merxmüller danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Professor Dr. O. Kandler gilt mein Dank für die Möglichkeit zur Fortführung meiner Arbeit und die Benutzung der Einrichtungen an seinem Institut.

LEBENS LAUF

Am 9. Dez. 1935 wurde ich als Sohn der Eheleute Paul und Genoveva Starosta in Oppeln/Oberschlesien geboren. Unter dem Druck der Kriegssereignisse siedelte die Familie nach Niederbayern um.

Von 1941 bis 1950 besuchte ich die Volksschule in Oppeln und Kirn, Kreis Pfarrkirchen. Anschließend begab ich mich in eine Elektromechanikerlehre in München und besuchte die Städtische Gewerbeschule für das Elektrohandwerk. Im Frühjahr 1955 unterzog ich mich der Gesellenprüfung.

Zwischen 1955 und 1960 arbeitete ich bei verschiedenen Elektrofirmen in München und besuchte gleichzeitig die Städtische Abendmittelschule, anschließend das Städtische Abendgymnasium für Berufstätige in München.

Nach Abschluß der Reifeprüfung im Jahre 1960 immatrikulierte ich mich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und studierte die Fächer Biologie, Chemie und Geographie. Ich beendete mein Studium mit der wissenschaftlichen Prüfung für das Lehramt an Gymnasien in den Jahren 1966 und 1967.

1966 begann ich mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit am Botanischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Professor Dr. A. Hager. Von 1967 bis 1969 war ich als wissenschaftliche Hilfskraft an diesem Institut angestellt. Seit September 1969 bin ich im Vorbereitungsdienst für das Lehramt an Gymnasien tätig.

